

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Section de pharmacie

Pharmacie galénique

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur P. BURI

---

# **Étude du transport de principes actifs incorporés dans des émulsions liquides de type huile dans eau**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de  
Genève pour obtenir le grade de docteur ès sciences,  
mention sciences pharmaceutiques

par

Annamaria Sautter  
de Lugano

Thèse No 1793



Juris Druck + Verlag Zurich

1977



UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DES SCIENCES

Section de pharmacie

Pharmacie galénique

Professeur P. BURI

---

# **Étude du transport de principes actifs incorporés dans des émulsions liquides de type huile dans eau**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de  
Genève pour obtenir le grade de docteur ès sciences,  
mention sciences pharmaceutiques

par

Annamaria Sautter  
de Lugano

Thèse No 1793



Juris Druck + Verlag Zurich

1977

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs P. BURI, professeur ordinaire et directeur de thèse, P. BOYMOND, professeur honoraire, et J. COTTE, professeur (faculté de pharmacie, Université de Lyon), autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 21 décembre 1976

Le Doyen:  
Jean MULLER

Thèse No 1793



Que le professeur P. Buri trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt et les encouragements qu'il a témoignés à ce travail entrepris sous sa direction.

J'adresse tous mes remerciements au professeur J. Cotte et au professeur P. Boymond qui ont accepté de faire partie du jury, ainsi qu'au professeur J. Tronchet, président de la Section de Pharmacie, qui a bien voulu présenter cette thèse à la Faculté des Sciences.

Je tiens à exprimer ma plus vive gratitude au docteur J. Doelker pour ses nombreux conseils et l'intérêt manifesté pour ce travail, à Madame D. Mordier pour son assistance technique, à Madame J. Blanc pour la dactylographie du texte, Monsieur J.P. Vuagniaux pour la réalisation des schémas.

Enfin, je remercie tous mes collègues du laboratoire de Pharmacie galénique pour leurs conseils.

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

TABLE DES MATIERES

|                                                                                        |    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Avant-propos                                                                           | p. | 1  |
| 1. Caractérisation et contrôle des émulsions avec le compteur de Coulter               |    | 2  |
| 1.1 Introduction générale                                                              |    | 2  |
| 1.2 Choix du modèle d'émulsion                                                         |    | 8  |
| 1.3 Critères de stabilité et de contrôle                                               |    | 10 |
| 1.4 Analyse granulométrique des émulsions H/E avec le compteur de Coulter              |    | 11 |
| 1.4.1 Historique et applications diverses du compteur de Coulter                       |    | 13 |
| 1.4.2 Principe du compteur de Coulter                                                  |    | 14 |
| 1.4.3 Application du compteur de Coulter à l'analyse granulométrique des émulsions H/E |    | 18 |
| 1.5 Partie expérimentale                                                               |    | 19 |
| 1.5.1 Choix des formules                                                               |    | 19 |
| 1.5.2 Fabrication des émulsions                                                        |    | 20 |
| 1.5.3 Mesure au compteur de Coulter                                                    |    | 21 |
| 1.5.4 Traitement des données                                                           |    | 23 |

|         |                                                                       |       |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.5.4.1 | Diamètres et volumes des particules                                   | p. 23 |
| 1.5.4.2 | Type ou distribution                                                  | 26    |
| 1.6     | Résultats et interprétation                                           | 28    |
| 1.6.1   | Influence du procédé et du facteur de dilution                        | 28    |
| 1.6.2   | Reproductibilité de fabrication                                       | 32    |
| 1.6.3   | Influence des électrolytes sur la stabilité des émulsions H/E diluées | 34    |
| 1.6.4   | Etude de stabilité en fonction des paramètres de formulation          | 41    |
| 1.7     | Conclusions                                                           | 43    |
| 2.      | Théorie et mise au point du modèle de libération                      | 44    |
| 2.1     | Introduction                                                          | 44    |
| 2.2     | Cinétique de libération d'un médicament à partir d'une émulsion H/E   | 45    |
| 2.2.1   | Présence d'une barrière interfaciale                                  | 47    |
| 2.2.2   | Absence d'une barrière interfaciale                                   | 52    |
| 2.3     | Choix et caractéristiques du traceur                                  | 57    |
| 2.3.1   | Dosage de l'étafédrine                                                | 60    |
| 2.3.2   | Remarques sur les coefficients de partage                             | 61    |

|       |                                                                                                          |       |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.4   | Description de la cellule de libération                                                                  | p. 64 |
| 2.5   | Mise en évidence d'une interaction<br>étafédrine-membrane de cellophane                                  | 68    |
| 2.5.1 | Partie expérimentale                                                                                     | 69    |
| 2.6   | Contrôle de la répartition du traceur<br>dans l'émulsion                                                 | 73    |
| 2.7   | Schéma expérimental général                                                                              | 74    |
| 2.8   | Reproductibilité des résultats de libération                                                             | 76    |
| 2.8.1 | Différence entre les cellules de diffusion                                                               | 76    |
| 2.8.2 | Reproductibilité de la diffusion entre<br>émulsions de même formule mais provenant de<br>lots différents | 78    |
| 2.9   | Détermination pratique du type de transport                                                              | 80    |
| 2.10  | Résumé et conclusions                                                                                    | 87    |
| 3.    | Etude de quelques paramètres influençant<br>le transport d'un traceur dans une<br>émulsion H/E           | 88    |
| 3.1   | Introduction                                                                                             | 88    |
| 3.2   | Valeurs des coefficients de perméabilité                                                                 | 89    |
| 3.3   | Influence de la concentration en traceur                                                                 | 91    |
| 3.4   | Influence du rapport des volumes des phases                                                              | 93    |

|     |                                                                                              |       |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.5 | Influence de la concentration en poly-sorbate 80 sur la vitesse de transport de l'étafédrine | p. 95 |
| 3.6 | Influence de la nature du traceur                                                            | 97    |
| 3.7 | Influence de la présence d'un émulateur complexe et de la valeur HLB                         | 101   |
| 3.8 | Conclusions                                                                                  | 104   |
| 4.  | Conclusions générales                                                                        | 106   |

\* \* \* \* \*

## AVANT-PROPOS

Parmi les nombreux travaux ou publications sur les émulsions, très peu concernent leur développement biopharmaceutique. Il s'agit surtout d'études technologiques et physico-chimiques, n'établissant que rarement des relations avec la libération des principes actifs.

Le but de ce travail est l'étude de la cinétique de transport d'un médicament lipophile incorporé dans la phase interne d'une émulsion de type H/E. Nous considérons parallèlement le passage de la phase interne à la phase externe du système dispersé et la libération de la substance dans un milieu récepteur.

Nous avons essayé de discerner l'importance relative de certains paramètres, tels que dimensions et distribution des particules de la phase dispersée ou nature de la barrière interfaciale, sur la vitesse de transport.

## 1. *Caractérisation et contrôle des émulsions avec le compteur de Coulter*

### 1.1 *Introduction générale*

Les travaux consacrés à la libération de médicaments incorporés à des émulsions sont relativement peu nombreux, alors qu'ils abondent pour les formes galéniques solides.

Pour les émulsions, l'étude physico-chimique et mathématique de ces phénomènes a véritablement débuté avec l'analyse théorique de la diffusion à travers des barrières hétérogènes proposée par Higuchi et Higuchi<sup>1</sup>.

L'ensemble des recherches qui ont suivi sont orientées vers différents domaines; le tableau 1 nous en présente une synthèse bibliographique.

Tableau 1

*Etudes consacrées au transport de substances dans des systèmes dispersés*

| Référence                                                         | Année | Auteurs                                              | But du travail                                                                           | Formes galéniques ou mélanges testés | Traceurs              |
|-------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| A. Libération à partir de systèmes semi-solides                   |       |                                                      |                                                                                          |                                      |                       |
| 2                                                                 | 1960  | <i>Higuchi</i>                                       | Analyse physico-chimique du processus d'absorption percutanée                            | Crèmes et pommades                   |                       |
| 3                                                                 | 1962  | <i>Higuchi</i>                                       | Libération à partir de pommades: traitement mathématique des données expérimentales      | Pommades hydrophiles                 | Iodure de sodium      |
| 4                                                                 | 1968  | <i>Müller</i><br><i>Kroggerus</i><br><i>Vuorinen</i> | Cinétique de diffusion de médicaments incorporés dans des formes galéniques semi-solides | Pommades, émulsions, suspensions     |                       |
| B. Transport interphasique dans les systèmes émulsionnés liquides |       |                                                      |                                                                                          |                                      |                       |
| 5                                                                 | 1964  | <i>Higuchi</i>                                       | Vitesse de transport d'un médicament hors des gouttelettes d'une émulsion                | Hexadécane, laurylsulfate de sodium  | Phthalate de dibutyle |

Tableau 1 (suite)

| Référence | Année | Auteurs                                         | But du travail                                                                                                          | Formes galéniques ou mélanges testés                                                           | Traceurs                               |
|-----------|-------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 6         | 1967  | <i>Goldberg<br/>Higuchi<br/>Ho<br/>Zograf</i>   | Mécanisme de transport interphasique; considérations théoriques de la diffusion en présence d'une barrière interfaciale |                                                                                                |                                        |
| 7         | 1969  | <i>Goldberg<br/>Higuchi<br/>Ho<br/>Zograf</i>   | Mécanismes de transport interphasique; aspects théoriques et interprétation des résultats                               | 1) Myristate d'isopropyle, polysorbate 80<br>2) Huile minérale, polysorbate 80, saccharose 75% | 1) Indoxole<br>2) Phtalate de dibutyle |
| 8         | 1968  | <i>Koizumi<br/>Higuchi</i>                      | Libération à partir d'émulsions E/H; traitement des données expérimentales                                              | Hexadécane, sesquioléate de sorbitane                                                          | Chlorure de pyridinium                 |
| 9         | 1968  | <i>Koizumi<br/>Higuchi</i>                      | Libération à partir d'émulsions E/H en fonction du pH; traitement mathématique des données expérimentales               | Idem                                                                                           | Idem                                   |
| 10        | 1969  | <i>Howard<br/>Farman<br/>Suzuki<br/>Higuchi</i> | Etude du transport interphasique; considérations théoriques                                                             |                                                                                                |                                        |

Tableau 1 (suite)

| Référence | Année | Auteurs                               | But du travail                                                                                                                                                                                    | Formes galéniques ou mélanges testés            | Traceurs                                           |
|-----------|-------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 11        | 1969  | Howard<br>Suzuki<br>Farvar<br>Higuchi | Etude du transport interphasique; partie expérimentale                                                                                                                                            | Hexadécane, cholate de sodium ou polysorbate 80 | Cholestérol, phtalate de diéthyle, di-nitrotoluène |
| 12        | 1969  | Ghanem<br>Higuchi<br>Simoneilli       | Transport interphasique en présence d'une barrière interfaciale.<br>I: Ralentissement du transport du phtalate de diéthyle en présence d'un film de gélatine adsorbé à l'interface eau-hexadécane | Hexadécane, gélatine, sulfate de sodium         | Phthalate de diéthyle                              |
| 13        | 1970  | Ghanem<br>Higuchi<br>Simoneilli       | II: Influence d'adjuvants sur la libération du phtalate de diéthyle à travers l'interface hexadécane-gélatine-eau                                                                                 | Idem                                            | Idem                                               |
| 14        | 1970  | Ghanem<br>Higuchi<br>Simoneilli       | III: Transport du cholestérol et d'autres substances organiques dans des matrices hexadécane-gélatine durcie-eau                                                                                  | Hexadécane, gélatine, sulfate de sodium, formol | Cholestérol, phthalate de diéthyle                 |
| 15        | 1970  | Higuchi<br>Ghanem<br>Bikhazi          | Etude du mécanisme de transport d'un médicament à l'interface H/E                                                                                                                                 | Hexadécane, gélatine, polysorbate 80            | Phthalate de diéthyle                              |

Tableau 1 (suite)

| Référence                              | Année | Auteurs                    | But du travail                                                                                             | Formes galéniques ou mélanges testés                                  | Traceurs                                                                                    |
|----------------------------------------|-------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16                                     | 1970  | Bikharî Higuchi            | Transport du cholestérol dans un système avec barrière interfaciale                                        | Hexadécane, polysorbate 80                                            | Cholestérol                                                                                 |
| 17                                     | 1971  | Bikharî Higuchi            | Transport de stérols et autres composés organiques                                                         | Hexadécane, polysorbate 80                                            | Cholestérol, $\beta$ -sitostérol, 20 $\alpha$ -hydroxy-cholestérol, Vitamine D <sub>3</sub> |
| 18                                     | 1972  | Surpuriya Higuchi          | Transport de stérols à travers l'interface H/E dans un système à deux tensio-actifs                        | Hexadécane, taurocholate de sodium-lécithine, laurylsulfate de sodium | Cholestérol, desmostérol                                                                    |
| 19                                     | 1973  | Yotzuyanagi Higuchi Ghanem | Aspects théoriques de la diffusion à l'intérieur et à travers des émulsions H/E avec barrière interfaciale |                                                                       |                                                                                             |
| C. Libération à partir d'émulsions E/H |       |                            |                                                                                                            |                                                                       |                                                                                             |
| 8                                      | 1968  | Koizumi Higuchi            | Voir ci-dessus                                                                                             |                                                                       |                                                                                             |
| 9                                      | 1968  | Koizumi Higuchi            | Idem                                                                                                       |                                                                       |                                                                                             |

Tableau 1 (suite)

| Référence                                                  | Année | Auteurs                   | But du travail                                                                                              | Formes galéniques ou mélanges testés                   | Traceurs        |
|------------------------------------------------------------|-------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|
| 20                                                         | 1971  | Waggoner<br>Fincher       | Influence de la valeur HLB sur la libération de l'éphédrine à partir de systèmes émulsionnés                | Polysorbate 60, monostéarate de sorbitane              | Ephédrine       |
| D. Libération à partir d'émulsions H/E                     |       |                           |                                                                                                             |                                                        |                 |
| V o i r   r é f é r e n c e s   5 - 7   e t   1 0 - 1 9    |       |                           |                                                                                                             |                                                        |                 |
| E. Libération à partir d'émulsions (tests <i>in vivo</i> ) |       |                           |                                                                                                             |                                                        |                 |
| 21                                                         | 1974  | Minkov<br>et coll.        | Etude biopharmaceutique des émulsions H/E                                                                   | Huile de tournesol, émulseurs non ioniques ou naturels | Acide benzoïque |
| 22                                                         | 1975  | Bates<br>Segueira         | Biodisponibilité de la griséofulvine micronisée à partir d'émulsions H/E; suspensions aqueuses et comprimés | Huiles végétales                                       | Griséofulvine   |
| F. Revues biopharmaceutiques concernant les émulsions      |       |                           |                                                                                                             |                                                        |                 |
| 23                                                         | 1967  | Higuchi                   | Modèles de diffusion utilisés en biopharmacie                                                               |                                                        |                 |
| 24                                                         | 1975  | Emmanuelli-<br>Orecchioni | Disponibilité de principes actifs dans les préparations émulsionnées                                        |                                                        |                 |

Sans être exhaustive, cette liste d'exemples nous montre que les premières publications concernent la libération d'un médicament à partir de pommades et l'établissement d'équations de base permettant de décrire ce phénomène.

Ensuite, les études concernent la vitesse de libération du médicament incorporé dans des émulsions en fonction de différents paramètres. Des corrélations ont été établies entre les données expérimentales et la théorie.

Ce n'est que plus tard, en utilisant une nouvelle technique, que plusieurs auteurs ont mis en évidence l'existence d'une barrière interfaciale huile/eau, qui s'oppose à la diffusion et qui a pu être déterminée quantitativement.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier quelques facteurs technologiques ou propriétés physico-chimiques de ces systèmes dispersés susceptibles d'influencer la vitesse de libération d'un médicament.

## *1.2 Choix du modèle d'émulsion*

Les émulsions trouvent de nos jours de nombreuses applications dans divers domaines (pharmaceutique, cosmétologique, etc.).

Bien que de moindre importance dans le groupe des préparations galéniques orales, ces formes médicamenteuses présentent un grand intérêt en tant que véhicule

pour l'administration de principes actifs liposolubles, augmentant les possibilités d'absorption.

L'un des buts de ce travail est d'établir des modèles simples d'émulsions H/E qui nous permettent de suivre, en fonction du temps, le transport d'un médicament de la phase interne à la phase externe, puis dans un milieu récepteur en faisant varier certains paramètres de fabrication ou de formulation. Les émulsions utilisées dans cette étude devront répondre aux critères suivants :

- Stabilité pendant toute la durée des expériences de libération.
- Possibilité d'une très bonne séparation de la phase externe pour doser le principe actif.
- Dimensions des particules permettant la mesure presque intégrale de la phase interne.

Pour l'étude granulométrique préliminaire avec le compteur de Coulter, nous avons porté notre choix sur un système liquide aussi simple que possible, ne comprenant que trois composants : eau distillée, polysorbate 80 et hexadécane. Les concentrations de ces 3 constituants ne sont pas précisées ici, puisque leur influence sur la taille et la distribution des particules sera étudiée dans ce chapitre.

Une stabilité optimale des émulsions préparées n'est pas le but à atteindre dans ce travail : en effet,

avec une dispersion trop fine, la séparation des deux phases serait plus difficile et une partie de la phase interne échapperait à l'analyse granulométrique.

Nous avons volontairement négligé la notion de HLB<sup>25</sup> et HLB critique d'une huile pour l'établissement de nos formules, ainsi que la méthode des diagrammes ternaires eau-surfactif-huile<sup>26</sup>. En effet, nous avons seulement cherché à obtenir un système dispersé liquide utilisable pour cette étude.

### *1.3 Critères de stabilité et de contrôle*

La connaissance précise de la structure et de la stabilité de l'émulsion est indispensable au type de recherche envisagé. Définir les critères de stabilité est assez complexe, puisqu'un très grand nombre de facteurs interviennent<sup>27</sup>.

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui évoluent plus ou moins rapidement au cours du temps. L'instabilité se manifeste par des changements dans les propriétés physiques de la dispersion, tels que l'aspect, la dimension des particules, les propriétés rhéologiques, etc., qui entraînent la sédimentation, le crémage ou la coalescence des gouttelettes.

La détermination des dimensions et de la distribution des particules de la phase dispersée est essentielle

pour étudier le transport des médicaments dans ces systèmes polyphasiques. En effet, en plus de la formulation de l'émulsion, la surface interfaciale par unité de poids ou de volume nous semble être, dans cette optique, la caractéristique la plus importante. Il est donc indispensable de connaître d'une part cette surface après fabrication de l'émulsion et dans quelle mesure elle est éventuellement modifiée au cours de l'expérience.

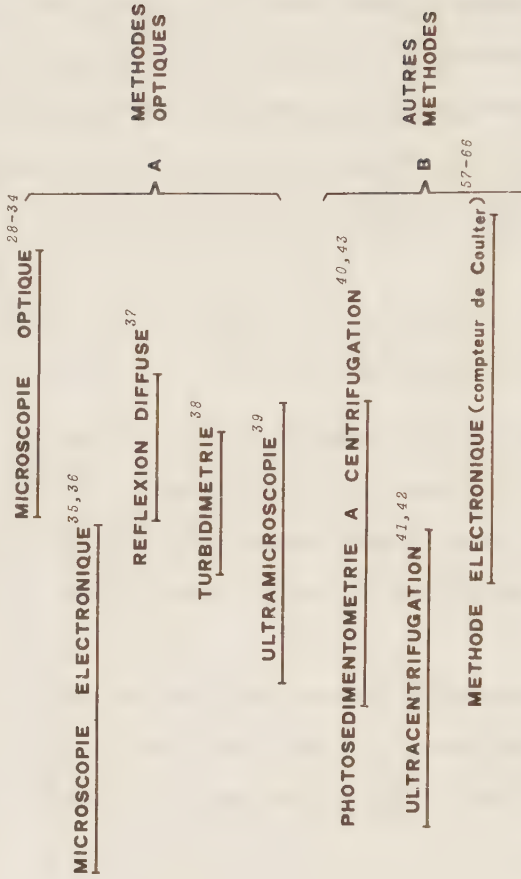
#### *4 Analyse granulométrique des émulsions H/E avec le compteur de Coulter*

L'analyse granulométrique est un domaine étendu et complexe. Un grand nombre de techniques ont été utilisées pour mesurer la dimension des gouttelettes des émulsions H/E. La figure 1 résume les principales ainsi que leur champ d'application.

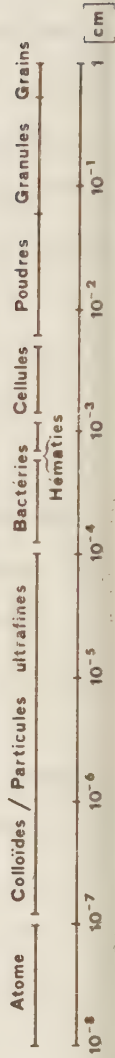
Les émulsions pharmaceutiques comportent généralement des gouttelettes de diamètres supérieurs à  $0,1 \mu\text{m}$ ; il est évident qu'aucune de ces méthodes ne couvre la totalité des diamètres.

Figure 1

*Champ d'application des méthodes d'analyse granulométrique*



## EMULSIONS



*Freshwater et coll.*<sup>40</sup> proposent l'utilisation simultanée des microscopes optique et électronique pour mesurer une gamme relativement large de dimensions. Mais l'emploi du premier est une méthode longue et fastidieuse, nécessitant le comptage d'un minimum de 300 particules pour obtenir une mesure statistiquement significative<sup>44</sup>. Le microscope électronique, lui, présente des difficultés de préparation des échantillons à analyser<sup>45</sup>.

Le compteur de Coulter a retenu notre attention pour sa précision et pour la rapidité des comptages. Comme on le verra par la suite, le maniement de ce compteur électronique, quoique relativement simple en pratique, suppose la connaissance de quelques notions théoriques nécessaires à une bonne interprétation des valeurs fournies. Il permet la mesure des gouttelettes telles qu'on les trouve dans la plupart des émulsions pharmaceutiques de type H/E. Cependant, une condition s'impose : comme il s'agit d'une méthode indirecte, les résultats doivent être le reflet réel de la structure de l'émulsion.

#### 1.4.1 *Historique et applications diverses du compteur de Coulter*

Mis au point en 1956 par Coulter pour le comptage des globules rouges<sup>46</sup>, cet appareil a été utilisé par la suite pour l'analyse d'autres particules; le tableau 2,

donne des exemples d'applications diverses.

Tableau 2

*Champ d'application du compteur de Coulter en pharmacie*

| Domaine d'utilisation                      | Références |
|--------------------------------------------|------------|
| Cellules du sang                           | 46 - 48    |
| Particules solides                         | 49, 50     |
| Vitesse de dissolution                     | 51, 52     |
| Particules étrangères dans les injectables | 53 - 56    |
| Gouttelettes huileuses des émulsions H/E   | 57 - 66    |
| Particules des suspensions pharmaceutiques | 67, 68     |
| Cellules bactériennes                      | 69 - 74    |
| Cellules vivantes (cultures de tissus)     | 75         |

#### *1.4.2 Principe du compteur de Coulter*

Le passage d'une particule suspendue dans un liquide conducteur à travers un orifice calibré provoque une augmentation instantanée de la résistance, proportionnelle au volume de la particule. La modification de

l'intensité du courant qui en résulte se traduit par une impulsion qui est amplifiée et comptée électroniquement. Le courant électrique est établi grâce à deux électrodes situées de part et d'autre de l'orifice.

Un discriminateur à seuil variable permet de supprimer les impulsions dont l'intensité est inférieure ou supérieure au niveau choisi.

Des volumes déterminés de liquide conducteur sont pompés successivement à travers l'orifice. La suspension doit être suffisamment diluée pour permettre le passage d'une seule particule à la fois à travers l'ouverture calibrée.

Au préalable, le compteur de Coulter doit être étalonné, généralement au moyen de particules de latex, afin d'établir une correspondance entre les réglages de l'appareil et les diamètres de sphères équivalentes des particules.

La formule suivante :

$$d_i = K \sqrt[3]{T_i} \quad (1)$$

nous donne cette correspondance, en sachant que :

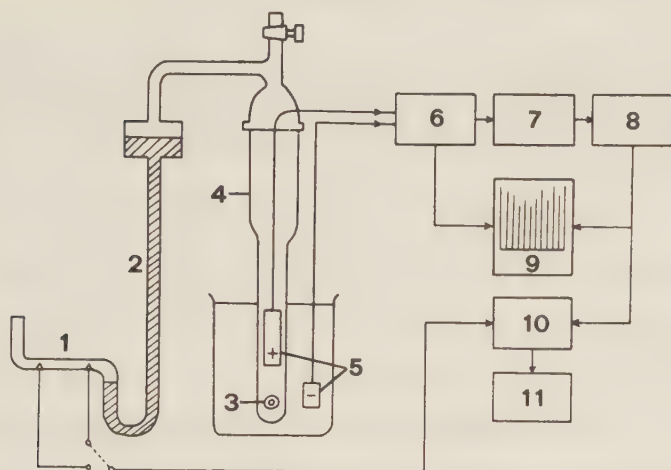
$$T_i = A \cdot I \cdot t_i \quad (2)$$

où  $K$  = constante d'étalonnage  
 $A$  = amplification des impulsions  
 $I$  = intensité du courant appliqué aux électrodes  
 $t_i$  = discrimination d'amplitude  
 $d_i$  = diamètre (de la  $i$ ème classe) correspondant au  
seuil fixé

Bien que le principe de cet appareil soit simple,  
il convient de prendre de nombreuses précautions, tant du  
point de vue de la mesure que de l'interprétation des  
résultats<sup>76</sup>.

Figure 2

*Diagramme schématique du compteur de Coulter*



1. Contact déterminant le volume d'aspiration
2. Manomètre à mercure
3. Ouverture de l'orifice
4. Tube à orifice
5. Electrodes
6. Amplificateur principal
7. Circuit de seuil
8. Amplificateur d'impulsions
9. Oscilloscope
10. Commande du compteur
11. Enregistreur digital

#### 1.4.3 Application du compteur de Coulter à l'analyse granulométrique des émulsions H/E

En 1962, Wachtel et La Meer<sup>57</sup> sont les premiers à utiliser le compteur de Coulter pour l'analyse d'émulsions monodispersées.

Par la suite, plusieurs auteurs ont développé cette technique : certains travaux relatent des comparaisons avec les résultats obtenus par d'autres méthodes de mesure<sup>38,40,59,63,77,78</sup>.

Cet appareil permet également l'étude des phénomènes d'agrégation des systèmes dispersés<sup>79-84</sup>; il est encore utilisé dans le cadre d'études biopharmaceutiques<sup>5,7,12-14,16</sup>,

Il ressort de cet ensemble de travaux quelques divergences au sujet du mode opératoire.

La première partie de cette étude consiste à déterminer l'influence de différents facteurs sur les valeurs fournies par l'appareil, tels que le procédé et le facteur de dilution ou encore le rôle joué par les électrolytes sur la stabilité de l'émulsion diluée.

Nous avons ensuite testé la reproductibilité de fabrication et la stabilité au cours du temps de l'émulsion type adoptée pour ces premiers essais.

## 1.5 *Partie expérimentale*

### 1.5.1 *Choix des formules*

De nombreux essais nous ont permis de choisir le système suivant, répondant aux exigences de notre recherche :

hexadécane<sup>\*</sup>  
polysorbate 80<sup>\*\*</sup>  
eau distillée<sup>\*\*\*</sup>

Ce modèle est souvent rencontré dans la littérature dans le cadre d'études physico-chimiques des émulsions.

L'hexadécane, non miscible à l'eau, présente par rapport à toute huile végétale l'avantage d'une composition chimique bien définie.

Le polysorbate 80, tensio-actif non ionique hydrosoluble, nous permet d'obtenir des émulsions de type H/E (HLB = 15) et n'est pas miscible à la phase interne.

Les paramètres de formulation que nous ferons varier seront la concentration en polysorbate 80 et le rapport des volumes des phases.

---

\* Hexadécane pur, Fluka A.G., CH-9470 Buchs.

\*\* Monoléylpolysorbitanne Ph. Helv. VI, Siegfried A.G. CH-4800 Zofingue.

\*\*\* Eau distillée répondant aux exigences de la Ph. Helv. VI.

### 1.5.2 Fabrication des émulsions

Des essais préliminaires de fabrication nous ont permis d'adopter la technique suivante, assurant une stabilité satisfaisante des émulsions et la possibilité de les contrôler avec les moyens dont nous disposons.

Le polysorbate 80 est dissous dans de l'eau distillée fraîchement bouillie et refroidie. L'hexadécane est ajouté avant dispersion du système qui se fait au moyen d'un homogénéisateur Ultra-Turrax<sup>R</sup> \* dont la tête est placée à 0,5 cm du fond du récipient. L'agitation (10.000 tpm) est maintenue 5 minutes à température ambiante. On laisse reposer l'émulsion ainsi préparée pendant 30 minutes avant de commencer les opérations de comptage.

Sauf indication contraire, toutes les émulsions seront préparées selon ce mode opératoire.

---

\* Ultra-Turrax<sup>R</sup> TP 18/2, Janke & Kunkel KG, IKA-Werk, 7813 Staufen, Allemagne.

### 1.5.3 Mesure au compteur de Coulter

Le compteur de Coulter<sup>\*</sup> est étalonné au moyen de particules de latex de diamètres connus<sup>\*\*</sup>, pour un capillaire de verre muni d'un orifice de 50  $\mu\text{m}$ . Le milieu conducteur choisi est une solution de NaCl 1%, préparée avec de l'eau distillée récemment bouillie, filtrée deux fois sur filtre Millipore<sup>R</sup> (0,22  $\mu$ ).

Avant toute mesure, on procède à un comptage de la solution d'électrolyte afin de déterminer le bruit de fond. L'échantillon à analyser est ensuite dilué généralement en deux étapes, d'abord dans de l'eau distillée puis dans le liquide conducteur.

Pour réduire les pertes de comptage dues aux passages en coïncidence de particules et pour éviter une saturation électronique de l'appareil, la dilution doit être adaptée pour compter au maximum 32.000 particules dans

---

\* Coulter Counter, Modèle Z<sub>B</sub>, Coulter Electronics Ltd, Dunstable, England, représenté par Instrumenten Gesellschaft A.G., CH-8000 Zürich.

\*\* Polystyrène DVB,  $\varnothing$  2,03 et 10,06  $\mu\text{m}$ .

le cas du capillaire de 50  $\mu\text{m}$ . On homogénéise la première dilution par agitation magnétique et la seconde avec l'agitateur de l'appareil.

Les mesures s'effectuent dans un bēcher de 50 ml sans agitation sur 0,05 ml de la dilution finale. En utilisant uniquement le seuil inférieur, nous obtenons des résultats cumulés.

Le manuel du compteur de Coulter précise que pour chaque diamètre, il est nécessaire de faire plusieurs comptages et d'en calculer la moyenne. De plus, il suggère qu'une précision statistiquement acceptable peut être obtenue en faisant

|       |           |      |     |         |    |            |
|-------|-----------|------|-----|---------|----|------------|
| 6 - 8 | comptages | pour | les | nombres | <  | 10         |
| 4 - 6 | "         | "    | "   | "       | <  | 100        |
| 2 - 4 | "         | "    | "   | "       | de | 100 à 1000 |
| 2     | "         | "    | "   | "       | >  | 1000       |

#### 1.5.4 Traitement des données

L'interprétation des résultats est basée sur l'information donnée par l'affichage numérique et les réglages de l'appareil ; de ceci nous tirons trois informations importantes :

- 1) Diamètres et volumes des particules.
- 2) Type de distribution.
- 3) Surface interne spécifique de la phase dispersée.

##### 1.5.4.1 Diamètres et volumes des particules

Le comptage brut nous donne un nombre de particules  $n$ , qui sera corrigé ( $N$ ) en fonction de la perte de coïncidence primaire et du bruit de fond.

$$N = n + n' - n'' \quad (3)$$

où  $n'$  = comptages en coïncidence

$n''$  = impulsions dues au bruit de fond

Il existe en effet une certaine probabilité que deux ou plusieurs particules occupent simultanément l'orifice et soient par conséquent comptées comme une seule particule.

Le manuel du fabricant\* donne une équation pour corriger le comptage brut  $n$ , valable pour les distributions étroites :

$$n' = p \cdot n^2 \cdot 10^{-6} \quad (3')$$

Le facteur de coïncidence  $p$  est obtenu par la formule suivante :

$$p = 2,5 \cdot (D/100)^3 \cdot 1500/V_m \quad (4)$$

où  $D$  et  $V_m$  sont respectivement le diamètre de l'orifice en  $\mu m$  et le volume du manomètre en  $\mu l$ .

Considérons la classe limitée pour les diamètres  $d_i$  et  $d_{i+1}$ , le volume moyen des particules de cette classe est le suivant :

$$\bar{V}_i = \frac{1}{2} (V_i + V_{i+1}) \quad (5)$$

La fraction du volume total des gouttelettes dans l'intervalle est représentée par :

$$Q_i = \bar{V}_i (N_{i+1} - N_i) \quad (6)$$

---

\* Manuel d'Instruction, Coultronics, France.

Si  $d_n$  est la plus petite dimension que l'on peut mesurer et  $d_z$  la plus petite particule de l'échantillon, 2 cas peuvent se présenter :

1. L'analyse est complète :  $d_n < d_z$ .

On peut calculer la fraction du volume total représentée par les particules dont le diamètre est supérieur à  $d_i$

$$C_i = \frac{\sum_{l=1}^i Q_l \cdot 100}{\sum_{l=1}^n Q_l} \quad (7)$$

2. L'analyse est incomplète :  $d_n > d_z$ .

C'est ce qui se passe avec les émulsions dans la plupart des cas. Il existe différentes techniques d'extrapolation qui permettent de trouver le nombre de particules qui échappent à l'analyse<sup>85-87</sup>. Soit  $N_z$  le nombre total des gouttelettes après extrapolation

$$Q_z = (N_z - N_n) \left( \frac{V_z + V_n}{2} \right) \quad (8)$$

$C_i$  est calculé au moyen de l'équation (7).

#### 1.5.4.2 Type ou distribution

La distribution logarithmico-normale est un modèle mathématique fréquemment rencontré pour décrire les distributions de particules

$$y = \frac{1}{\ln \sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[ - \frac{(\ln x - \ln D)^2}{2 \ln^2 \sigma} \right] \quad (9)$$

où  $y$  = fonction de probabilité

$x$  = diamètre des particules

$\sigma$  = déviation standard

$D$  = diamètre géométrique moyen

Le logarithme de la taille des particules en fonction des fréquences cumulées (en %) sur un axe de probabilité donne une droite si la distribution est logarithmico-normale.

Plutôt que de caractériser imparfaitement l'émulsion par un diamètre moyen, nous avons préféré considérer, comme critère de stabilité, la surface de la phase interne. Dans ce but, nous définissons la surface interne spécifique ( $S_{int} \text{ en cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ ) comme la surface totale des gouttelettes par unité de volume d'émulsion.

La surface de la phase interne de la dilution finale ( $S_{dil}$ ), pour un comptage de N classes, est donnée par :

$$S_{dil} = \pi \sum_{i=1}^N n_i d_i^2 \quad (10)$$

où  $n_i$  et  $d_i$  sont respectivement le nombre de particules et le diamètre moyen de chaque classe. D'autre part, il est nécessaire d'extrapoler la surface non mesurable, selon les prescriptions du manuel de l'appareil.

#### 5.4.3 Surface interne spécifique de la phase dispersée

La surface interne spécifique  $S_{int}$  de l'émulsion est alors calculée à partir de la surface totale extrapolée  $S_{extr}$  :

$$S_{int} = \frac{S_{extr} \cdot F}{V_m} \quad (11)$$

F et  $V_m$  représentent le facteur de dilution et le volume mesuré.

Les calculs de la surface interne spécifique, du diamètre géométrique et de la déviation standard sont effectués au moyen de l'ordinateur CDC 3800 du Centre Cantonal Neuchâtois d'Informatique (Langage Fortran).

## *1.6 Résultats et interprétation*

### *1.6.1 Influence du procédé et du facteur de dilution*

L'analyse granulométrique des émulsions au compteur de Coulter rend indispensable une dilution adéquate dans un milieu approprié. Il convient de ce fait de disposer d'un procédé reproductible qui respecte la stabilité de l'émulsion. A cet égard, nous comparons différentes techniques rencontrées dans la littérature pour un même facteur final de dilution dans le milieu de mesure. Dans le cas d'une première dilution, le volume nécessaire d'émulsion est pesé, puis dilué et homogénéisé. En effet, des essais préliminaires ont montré qu'un prélèvement avec une pipette donnait des résultats imprécis, même après rinçage.

Par contre, pour la seconde dilution, on emploie une pipette à un trait de jauge pour des prélèvements de 0,5 ml ou plus et une micropipette à constriction Bie-Bernstein pour des volumes inférieurs. Une micropipette est également utilisée pour la dilution directe. Chaque procédé est effectué 5 fois afin de déterminer l'écart-type de la technique correspondante.

Nous avons expressément renoncé à ajouter un tensio-actif à la solution électrolytique, bien que cette adjonction soit préconisée par plusieurs auteurs<sup>58,60,88</sup>;

En effet, la filtration d'une telle solution provoque la formation de bulles d'air difficiles à éliminer<sup>89</sup>.

En plus du procédé de dilution, nous avons considéré l'influence du facteur de dilution, tout en respectant les limites de concentrations en particules précédemment mentionnées (chap. I.5.3). Pour cela, nous avons adopté une dilution en deux étapes, qui présente une bonne reproductibilité, soit le troisième procédé des tableaux 4 et 5, qui permet de faire varier le facteur de dilution finale. Pour chaque facteur de dilution, nous avons aussi répété la mesure trois fois.

Toutes les valeurs exprimées dans les tableaux 4 et 5 proviennent de mêmes lots d'émulsions, correspondant respectivement aux formules A et B (tabl. 3).

Tableau 3

*Composition des émulsions A et B*

| Substance [g]                   | A  | B  |
|---------------------------------|----|----|
| Hexadécane                      | 10 | 10 |
| Solution de polysorbate 80 0,1% | 90 | -- |
| Solution de polysorbate 80 0,2% | -- | 90 |

Tableau 4

a) Influence du procédé de dilution sur la surface interne spécifique d'une émulsion (A)

| No | Première dilution (D)               | Seconde dilution             | Facteur de dilution | Surface int. spécifique moyenne $\left[ \frac{2}{\text{cm}^2 \cdot \text{cm}} \right]$ | Ecart-type | F <sub>calc</sub> | F <sub>table</sub> 0,05 | Degrés de liberté |
|----|-------------------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| 1  | 0,01 ml A + NaCl 1% ad 250 ml       | —                            | 25000               | 902,7                                                                                  | + 15,3     | 0,93              | 3,49                    | 3 et 12           |
| 2  | 0,5 ml A + NaCl 1% ad 250 ml        | 1 ml D + NaCl 1% ad 50 ml    | 25000               | 879,1                                                                                  | + 12,3     |                   |                         |                   |
| 3  | 1 ml A + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,2 ml D + NaCl 1% ad 50 ml  | 25000               | 895,3                                                                                  | + 37,6     |                   |                         |                   |
| 4  | 2 ml + H <sub>2</sub> O ad 10 ml    | 0,01 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 25000               | 907,9                                                                                  | —          |                   |                         |                   |

b) Influence du facteur de dilution sur la surface interne spécifique d'une émulsion (A)

|   | Première dilution (D)               | seconde dilution            | Facteur de dilution | Surface int. spécifique moyenne $\left[ \frac{2}{\text{cm}^2 \cdot \text{cm}} \right]$ | Ecart-type | F <sub>calc</sub> | F <sub>table</sub> 0,05 | Degrés de liberté |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 1 ml A + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,5 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 10000               | 889,2                                                                                  | + 32,2     | 0,21              | 3,88                    | 2 et 12           |
| 1 | 1 ml A + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,2 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 25000               | 895,3                                                                                  | + 37,6     |                   |                         |                   |
| 1 | 1 ml A + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,1 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 50000               | 883,2                                                                                  | + 12,1     |                   |                         |                   |

Tableau 5

a) Influence du procédé de dilution sur la surface interne spécifique d'une émulsion (B)

| No | Première dilution (D)               | Seconde dilution             | Facteur de dilution | Surface int. spécifique moyenne $\left[ \frac{2}{\text{cm}^2} \cdot \text{cm}^{-3} \right]$ | Ecart-type | F <sub>calc</sub> | table F <sub>0,05</sub> | Degrés de liberté |
|----|-------------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| 1  | 0,01 ml B + NaCl 1% ad 250 ml       | —                            | 25000               | 1344,9                                                                                      | + 74,3     |                   |                         |                   |
| 2  | 0,5 ml B + NaCl 1% ad 250 ml        | 1 ml D + NaCl 1% ad 50 ml    | 25000               | 1364,3                                                                                      | + 17,7     |                   |                         |                   |
| 3  | 1 ml B + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,2 ml D + NaCl 1% ad 50 ml  | 25000               | 1321,7                                                                                      | + 48,6     | 1,47              | 3,24                    | 3 et 16           |
| 4  | 2 ml B + H <sub>2</sub> O ad 10 ml  | 0,01 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 25000               | 1380,5                                                                                      | + 22,9     |                   |                         |                   |

b) Influence du facteur de dilution sur la surface interne spécifique d'une émulsion (B)

| Première dilution (D)               | Seconde dilution            | Facteur de dilution | Surface int. spécifique moyenne $\left[ \frac{2}{\text{cm}^2} \cdot \text{cm}^{-3} \right]$ | Ecart-type | F <sub>calc</sub> | table F <sub>0,05</sub> | Degrés de liberté |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| 1 ml B + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,5 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 10000               | 1329,4                                                                                      | + 20,5     |                   |                         |                   |
| 1 ml B + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,2 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 25000               | 1321,7                                                                                      | + 48,6     | 1,73              | 3,88                    | 2 et 12           |
| 1 ml B + H <sub>2</sub> O ad 100 ml | 0,1 ml D + NaCl 1% ad 50 ml | 50000               | 1359,3                                                                                      | + 25,3     |                   |                         |                   |

Les analyses de variance effectuées sur les résultats mentionnés dans ces tableaux montrent que dans tous les cas

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{table}} \text{ pour } P = 0,05$$

Les procédés de dilution, ainsi que les facteurs de dilution sont identiques pour chaque série et ne modifient pas la surface interne spécifique. Il faut cependant préciser qu'en raison d'un ennui technique survenu en fin d'expérience, nous ne pouvons disposer que d'une seule valeur pour le quatrième procédé de dilution de la formule A.

Dans tous les cas, la reproductibilité des techniques est satisfaisante. Toutefois, les émulsions nécessitent des dilutions assez fortes pour leur analyse avec le compteur de Coulter : cette dilution comporte des risques d'erreur assez élevés et doit être effectuée avec grand soin.

#### *1.6.2 Reproductibilité de fabrication*

En vue des essais futurs, il était nécessaire de connaître la reproductibilité de fabrication de l'émulsion. Le tableau 6 donne les valeurs des surfaces internes spécifiques mesurées sur 3 lots différents d'émulsions de formule identique (formule B), préparées selon le mode opératoire

décrit sous I.5.2. Chaque lot a été analysé 5 fois à partir d'une nouvelle dilution.

Tableau 6

*Reproductibilité de fabrication entre 3 lots différents  
d'émulsions de formule identique*

| Lot No | Surface interne spécifique<br>moyenne $[\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}]$ | Ecart-type |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1      | 1321,7                                                                     | $\pm 48,6$ |
| 2      | 1316,4                                                                     | $\pm 17,9$ |
| 3      | 1326,7                                                                     | $\pm 39,3$ |

Une analyse de variance effectuée sur les résultats cités dans le tableau 6 nous montre que les lots 1, 2 et 3 sont identiques :

$$F_{\text{calc}} = 0,01 \ll F_{0,05}^{(2,12)} = 3,88$$

Pour la suite de notre travail, nous avons choisi le troisième procédé de dilution des tableaux 4 et 5 et chaque émulsion, sans autres précisions, ne sera mesurée qu'une seule fois.

### 1.6.3 Influence des électrolytes sur la stabilité des émulsions H/E diluées

Le compteur de Coulter permet de mesurer le nombre et la grandeur des particules, si ces dernières sont en suspension dans un liquide conducteur.

Généralement, l'adjonction d'électrolytes à un système dispersé provoque une diminution des barrières énergétiques qui s'opposent à l'agréation des particules, d'où une diminution de la stabilité de la dispersion qui servira à l'analyse. Malgré cela, peu d'auteurs semblent avoir rencontré de tels inconvénients.

Les solutions d'électrolytes le plus souvent utilisées sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7

*Composition des milieux conducteurs*

| Concentration<br>NaCl [%] | Tensio-actif ou<br>autre adjonction | Références |
|---------------------------|-------------------------------------|------------|
| 0,9                       | —                                   | 5          |
| 2 ou 6                    | —                                   | 59         |
| 0,9                       | Polysorbate 80 0,1%                 | 62,88      |
| 0,75                      | Polysorbate 80 0,1%                 | 58         |
| 0,75                      | Laurylsulfate de sodium 0,1%        | 58         |
| 0,9                       | Cétrimide 0,03 M                    | 60         |
| 1                         | Glycérol                            | 90         |

Singleton et Brown<sup>91</sup> ont contrôlé au moyen du compteur de Coulter des émulsions du commerce destinées à la voie intraveineuse. De leurs travaux, il ressort que la dilution de l'émulsion dans la solution d'électrolyte provoque immédiatement la formation d'agrégats de gouttelettes. Le phénomène remarqué est une fonction variable, non linéaire du temps.

Ces auteurs prétendent que pour avoir un comptage électronique correct, il est nécessaire de connaître le temps écoulé depuis le moment de la dilution de l'échantillon dans la solution de mesure jusqu'au début de chaque cycle de comptage. Les valeurs obtenues seront alors corrigées par extrapolation au temps zéro.

Il nous a donc paru indispensable d'étudier la reproductibilité des mesures en fonction du temps et de la concentration en électrolyte. Nous étudions au préalable la reproductibilité des mesures sur une suspension de particules de latex ( $\emptyset$  moyen =  $1,87 \mu$ ) avant d'analyser deux émulsions C et D (tabl. 8).

Tableau 8

*Composition des émulsions C et D*

| Substance [g]  | C    | D    |
|----------------|------|------|
| Hexadécane     | 10   | 10   |
| Polysorbate 80 | 0,1  | 0,2  |
| Eau distillée  | 89,9 | 89,8 |

Chaque émulsion est diluée en deux étapes, comme il a été indiqué précédemment. On procède immédiatement à un cycle de comptage afin de caractériser entièrement la formule

préparée. Puisqu'un cycle de comptage nécessite 10 à 15 minutes du moment où la dilution est prête jusqu'à la fin de l'analyse, on vérifiera la reproductibilité des mesures pendant ce temps.

Pour cela, on mesure toutes les minutes (pendant 15 minutes) et pour chaque formule, le nombre total de particules plus grandes que 3 diamètres choisis.

Une nouvelle dilution est préparée pour chaque série de mesures, pour chacun des diamètres. Le choix des diamètres se fait en fonction du nombre compté.

Les résultats obtenus avec le latex (tabl. 9) montrent une bonne reproductibilité des mesures, surtout dans le cas du plus petit diamètre.

Tableau 9

*Reproductibilité des mesures des particules de latex*

| Diamètre latex<br>[ $\mu\text{m}$ ] | Nombre moyen<br>n | Ecart-type théorique *<br>$\sqrt{n}$ | Ecart-type expérimental |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 2,29                                | 3111              | 55,8                                 | 79,0                    |
| 1,82                                | 11546             | 107,5                                | 77,8                    |

\* Valable pour les distributions homogènes

La reproductibilité est moins bonne pour les émulsions C et D que pour le latex. Ce phénomène peut être en partie expliqué par une distribution plus étendue.

Les figures 3 et 4 représentent les mesures faites pour les émulsions avec NaCl 1% et 2%.

Ces résultats permettent de tirer les conclusions suivantes :

- On n'observe aucune évolution du nombre de gouttelettes au cours du temps, mais une dispersion relativement régulière comprise dans les limites de confiance.
- La reproductibilité est souvent meilleure lorsque le diamètre est plus petit, le nombre compté étant plus élevé, ce que nous avons constaté avec les particules de latex.
- La stabilité de l'émulsion joue aussi un rôle : l'émulsion D, la plus finement dispersée, présente une meilleure reproductibilité que l'émulsion C dans NaCl 1%.

En conclusion de cette étude, il ressort qu'il est préférable d'effectuer le comptage dans le plus bref délai, afin de ne pas modifier la structure initiale de l'émulsion analysée.

Figure 3

Stabilité de l'émulsion diluée dans NaCl 1%,  
comptage à trois seuils différents

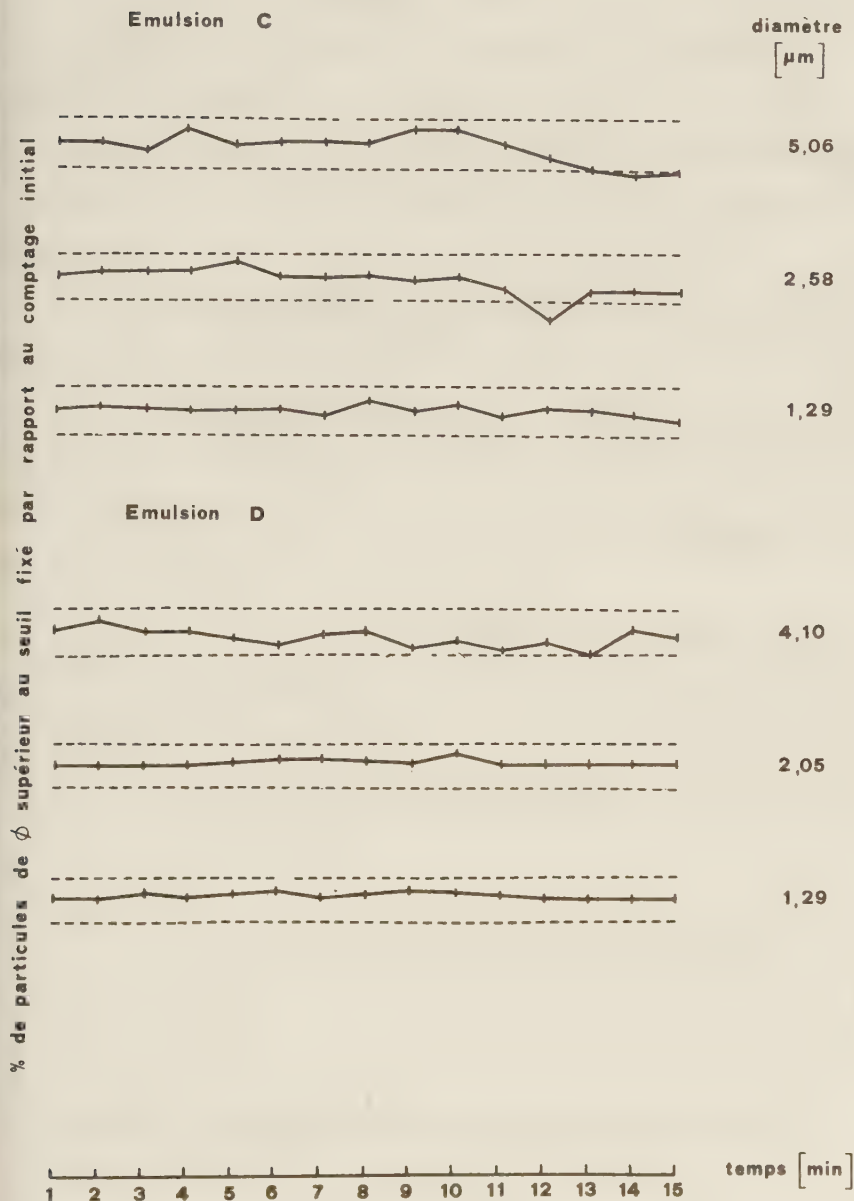
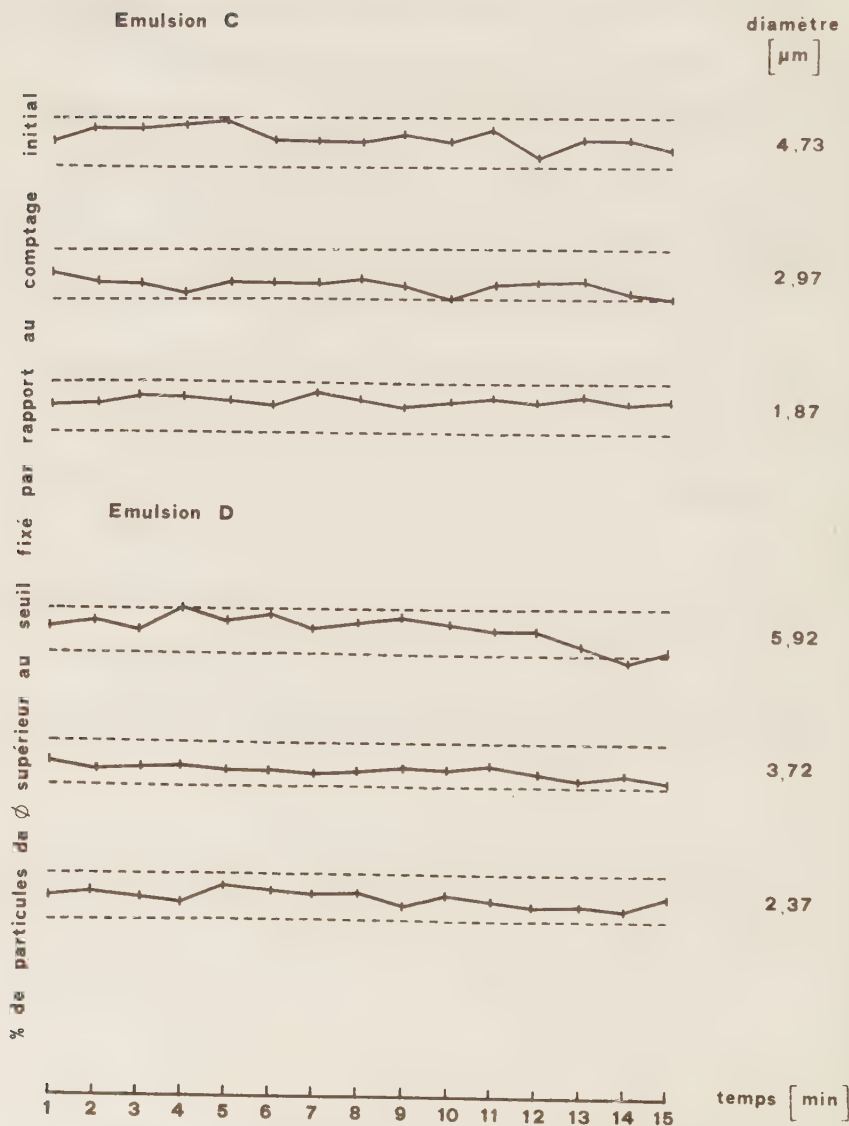


Figure 4

Stabilité de l'émulsion diluée dans NaCl 2%,  
comptage à trois seuils différents



#### 1.6.4 Etude de stabilité en fonction des paramètres de formulation

Après ces quelques essais préliminaires qui nous ont permis de mettre au point une méthode d'analyse granulométrique reproductible pour les émulsions de type H/E, nous avons procédé à une étude de stabilité au cours du temps de 8 émulsions dont les formules sont schématisées dans le tableau 10.

Des cycles de comptage ont été effectués 1 heure après fabrication ainsi qu'après 24, 48, 72, 96 et 168 heures.

Les résultats cités dans le tableau 10 prouvent que les émulsions préparées sont stables pendant 96 heures. On constate ensuite une forte diminution de la surface interne spécifique pour chaque formule.

Nous n'avons pas poussé plus loin l'interprétation de ces résultats car dans la suite de ce travail toutes les émulsions seront fabriquées et caractérisées immédiatement et les expériences faites dans ce délai.

Tableau 10  
Composition des émulsions pour l'étude de la stabilité

| Formule            | E                                                               | F      | G      | H      | I      | J     | K      | L      |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
| Hexadécane [g]     | 10,0                                                            | 10,0   | 10,0   | 10,0   | 10,0   | 5,0   | 15,0   | 20,0   |
| Polysorbate 80 [g] | 0,5                                                             | 0,4    | 0,3    | 0,2    | 0,1    | 0,1   | 0,1    | 0,1    |
| Eau distillée [g]  | 89,5                                                            | 89,6   | 89,7   | 89,8   | 89,9   | 94,9  | 84,9   | 79,9   |
| Temps [heures]     | Surface interne spécifique $[\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}]$ |        |        |        |        |       |        |        |
| 1                  | 2057,5                                                          | 1818,5 | 1762,3 | 1350,1 | 1108,1 | 706,5 | 1459,7 | 1700,2 |
| 24                 | 1878,8                                                          | 1957,2 | 1727,6 | 1484,2 | 1199,7 | 703,1 | 1500,3 | 1582,9 |
| 48                 | 2037,8                                                          | 1804,8 | 1805,2 | 1510,8 | 1214,7 | 780,9 | 1521,3 | 1750,1 |
| 72                 | 2019,9                                                          | 1839,1 | 1724,8 | 1539,1 | 1202,9 | 687,9 | 1463,3 | 1419,4 |
| 96                 | 2077,5                                                          | 1919,7 | 1736,4 | 1479,6 | 1136,2 | 741,1 | 1360,9 | 1559,1 |
| 168                | 1420,9                                                          | 1482,9 | 1427,4 | 1190,1 | 972,1  | 632,4 | 1068,1 | 1137,2 |

## 1.7 Conclusions

Le compteur de Coulter permet de caractériser avec précision la distribution de la phase interne d'une émulsion H/E.

Les résultats cités dans cette première partie montrent que :

- Le procédé et le facteur de dilution n'ont pas d'influence sur le comptage des particules. Toutefois, il convient de respecter certaines conditions opératoires et de ne pas dépasser les limites de comptage propres à l'appareil.
- La reproductibilité de fabrication de l'émulsion modèle est bonne.
- Le comptage doit être effectué dans un délai rapide pour que les résultats soient le reflet réel de la structure de l'émulsion.

L'étude de stabilité en fonction de paramètres de formulation, nous a montré que le modèle choisi présente une stabilité suffisante au cours du temps et répond bien aux exigences formulées.

Ainsi, nous disposons pour la suite de notre travail d'un moyen analytique qu'il sera possible d'adapter pour des émulsions de formulation différente.

## 2. *Théorie et mise au point du modèle de libération*

### 2.1 *Introduction*

La libération *in vitro* d'un médicament incorporé dans la phase interne d'une émulsion H/E comporte principalement deux étapes : dans un premier stade, le médicament passe de la phase interne à la phase externe par diffusion; ensuite, il diffuse de la phase externe de l'émulsion dans le milieu récepteur.

Nous avons élaboré, pour notre étude, un modèle simple d'émulsion H/E qui permet une très bonne séparation des deux phases, indispensable pour suivre le changement des concentrations en fonction du temps dans la phase aqueuse. Le traceur du modèle est choisi en raison de son coefficient de partage favorable à une telle étude.

La détermination du nombre de particules de la phase interne et de leur surface totale permet de caractériser les émulsions étudiées et de s'assurer de leur stabilité pendant la durée des expériences.

La vitesse de libération est mesurée à l'aide d'une cellule de dialyse, dont les deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable. Celle-ci joue uniquement un rôle de séparation entre le compartiment qui

contient l'émulsion et le compartiment récepteur.

Après quelques considérations théoriques sur les processus de transport au sein des émulsions, nous décrivons l'appareillage utilisé et étudierons sa reproductibilité.

## 2.2 Cinétique de libération d'un médicament à partir d'une émulsion H/E<sup>4,6,7,16,17</sup>

Lorsqu'un médicament se trouve incorporé dans la phase interne d'une émulsion H/E, deux étapes sont susceptibles de contrôler la vitesse de libération :

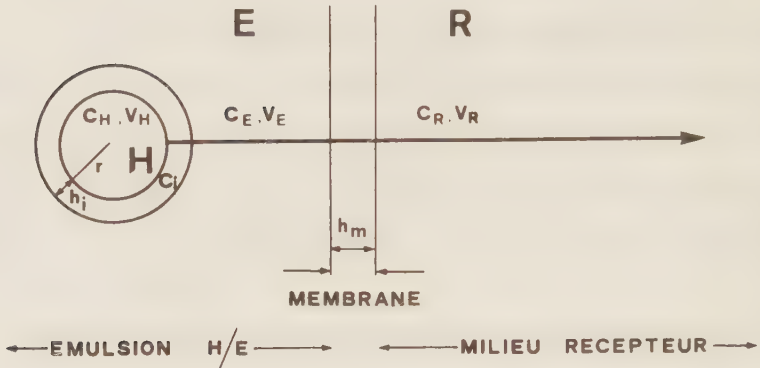
- Le transport de la substance de la phase interne à la phase externe à travers la barrière interfaciale.  
(Nous avons expressément écarté, dans notre cas, la présence d'une barrière de type électrique, non compatible avec le système étudié).
- La vitesse de diffusion dans le milieu aqueux.

La cellule utilisée (voir fig. 8) comportant une agitation de l'émulsion et du milieu récepteur, la diffusion se trouve confinée à la membrane de cellophane.

Pour le modèle considéré, le processus complet de transport peut être illustré de la manière suivante :

Figure 5

*Illustration du processus de transport d'un traceur  
dans une émulsion H/E*



H phase huileuse

E phase aqueuse

R milieu récepteur

$C_H$  et  $V_H$  concentration et volume de la phase huileuse

$C_E$  et  $V_E$  " " " " " " aqueuse

$C_R$  et  $V_R$  " " " du milieu récepteur

$C_i$  concentration dans la barrière interfaciale

$h_i$  épaisseur de la barrière interfaciale

$r$  rayon de la gouttelette huileuse

$h_m$  épaisseur de la membrane de cellophane



En accord avec la première loi de Fick, les équations différentielles suivantes décrivent les processus de diffusion dans le modèle considéré :

$$V_E \frac{dC_E}{dt} = S_i P_i (C_i - C_E) - \frac{S_m D}{h_m} (C_E - C_R) \quad (12)$$

$$V_R \frac{dC_R}{dt} = \frac{S_m D}{h_m} (C_E - C_R) \quad (13)$$

où  $S_i$  = surface de la barrière interfaciale, c'est-à-dire surface d'une gouttelette huileuse de rayon moyen  $r$  multipliée par le nombre total de gouttelettes  $N$  ( $4\pi r^2 N$ )

$P_i$  = coefficient de perméabilité de la barrière interfaciale au traceur ( $P_i = D_i/h_i$ )

$S_m$  = surface active de diffusion de la membrane de cellophane

$D$  = coefficient de diffusion du traceur à travers la membrane

Si l'on veut connaître la concentration de traceur dans les différentes phases au cours du temps, il est nécessaire de considérer les deux conditions limites suivantes :

- a) Si  $S_m D/h_m \gg S_i P_i$ , c'est-à-dire si la diffusion est plus rapide à travers la membrane que de la phase interne à la phase externe de l'émulsion, les concentrations  $C_R$  et  $C_E$  tendent à s'équilibrer et on peut poser :

$$C_R \approx C_E \text{ et par conséquent } dC_R \approx dC_E$$

L'équation (12) devient

$$V_E \frac{dC_E}{dt} = S_i P_i \left( \frac{C_H}{K'} - C_R \right) \quad (14)$$

La quantité totale T de traceur mise en jeu est égale à tout moment à

$$T = C_H V_H + C_E V_E + C_R V_R \quad (15)$$

De l'équation de bilan (15), on peut tirer la concentration dans la phase huileuse

$$C_H = \frac{T - C_R (V_E + V_R)}{V_H} \quad (15')$$

En remplaçant  $C_H$  par sa valeur, dans l'équation (14), celle-ci devient

$$V_E \frac{dC_E}{dt} = S_i P_i \left( \frac{T - C_R (V_E + V_R + K' V_H)}{V_H K'} \right) \quad (16)$$

L'équation (17) est obtenue après séparation des variables et peut être intégrée dans les limites  $C_R = 0, C_R$  et  $t = 0, t$

$$\int_0^{C_R} \frac{dC_R}{T - C_R (V_E + V_R + K' V_H)} = \int_0^t \frac{S_i P_i}{V_H K'} \cdot dt \quad (17)$$

Après intégration et réarrangement, on obtient\*

$$\ln \frac{1}{T} \left[ T - C_R (V_E + V_R + K' V_H) \right] = - \frac{V_R + K' V_H + V_E}{V_H K'} S_i P_i \cdot t \quad (18)$$

L'équation (18) est mise sous forme exponentielle :

---


$$* \int \frac{dx}{b-ax} = \frac{1}{a} \ln (b-ax)$$

$$C_R = \frac{T}{V_E + V_R + K' V_H} \left[ 1 - \exp \left( - \frac{V_R + K' V_H + V_E}{V_H K'} S_i P_i \cdot t \right) \right] \quad (19)$$

Le pourcentage libéré est alors donné par

$$\% = \frac{100 V_R}{V_R + K' V_H + V_E} \left[ 1 - \exp \left( - \frac{V_R + K' V_H + V_E}{V_H K'} S_i P_i \cdot t \right) \right] \quad (20)$$

- b) Dans le cas contraire, si  $S_m D / h_m \ll S_i P_i$ , les concentrations à l'interface et dans la phase aqueuse sont pratiquement identiques ( $C_i \cong C_E$ ) et l'équation (12) se simplifie comme suit :

$$V_E \frac{dC_E}{dt} = - V_R \frac{dC_R}{dt} = - \frac{S_m D}{h_m} (C_E - C_R) \quad (21)$$

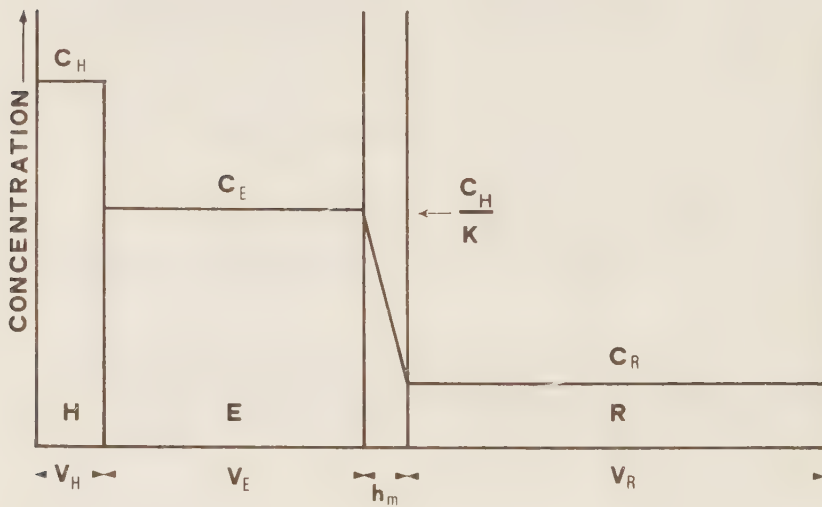
Cette condition correspond à l'absence d'une barrière interfaciale. Son développement mathématique est donc étudié ci-après.

### 2.2.2 Absence d'une barrière interfaciale

Dans le cas extrême de l'absence d'un film interfacial s'opposant à la diffusion, le profil de concentrations se trouve simplifié (fig. 7).

Figure 7

*Profil de concentrations dans une émulsion H/E en absence d'une barrière interfaciale\**



K Coefficient de partage ( $C_H/C_E$ )

\* Pour les autres symboles, se référer à la figure 5

Cette situation est décrite par l'équation différentielle (21).

Par définition, le coefficient de partage K est égal à

$$K = \frac{C_H}{C_E} \quad (22)$$

et d'après l'équation de bilan (15)

$$C_E = \frac{T - C_R V_R}{K V_H + V_E} \quad (23)$$

En remplaçant  $C_E$  par sa valeur donnée par l'équation de bilan, la relation (21) devient :

$$V_R \frac{dC_R}{dt} = \frac{S_m D}{h_m} \frac{T - (V_R + K V_H + V_E) C_R}{K V_H + V_E} \quad (24)$$

Après séparation des variables, cette dernière expression est intégrable, dans les conditions limites  $t = 0$ ,  $t$  et  $C_R = 0$ ,  $C_R$ .

$$\int_0^{C_R} \frac{dC_R}{T - (V_R + K V_H + V_E) C_R} = \int_0^t \frac{S_m D}{h_m} \frac{1}{V_R (K V_H + V_E)} dt \quad (25)$$

L'équation (25) devient alors :

$$\ln \frac{1}{T} \left[ T - (V_R + KV_H + V_E) C_R \right] = - \frac{V_R + KV_H + V_E}{V_R (KV_H + V_E)} \cdot \frac{S_m D}{h_m} \cdot t \quad (26)$$

ou sous forme exponentielle,

$$C_R = \frac{T}{V_R + KV_H + V_E} \left[ 1 - \exp \left( - \frac{V_R + KV_H + V_E}{V_R (KV_H + V_E)} \cdot \frac{S_m D}{h_m} \cdot t \right) \right] \quad (27)$$

Le pourcentage libéré est alors donné par

$$\% = \frac{100 V_R}{V_R + KV_H + V_E} \left[ 1 - \exp \left( - \frac{V_R + KV_H + V_E}{V_R (KV_H + V_E)} \cdot \frac{S_m D}{h_m} \cdot t \right) \right] \quad (28)$$

A partir de l'équation de bilan, il est également possible de calculer, au temps  $t$ , les pourcentages respectivement dans la phase huileuse (éq. 29) et la phase aqueuse de l'émulsion (éq. 30)

$$\% = \frac{100 V_H}{T} \left( \frac{T - C_R V_R}{V_H + V_E / K} \right) \quad (29)$$

et

$$\% = \frac{100 V_E}{T} \left( \frac{T - C_R V_R}{KV_H + V_E} \right) \quad (30)$$

En résumé, lorsqu'un médicament se trouve incorporé dans la phase interne d'une émulsion H/E, il n'existe une solution analytique que dans deux cas limites :

- en présence d'une barrière interfaciale lorsque

$$\frac{S_m D}{h_m} \gg S_i P_i \quad (\text{cf. éq. 18})$$

- en absence d'un tel film, lorsque

$$\frac{S_m D}{h_m} \ll S_i P_i \quad (\text{cf. éq. 26})$$

L'examen de l'équation (26) montre qu'en portant graphiquement en ordonnée  $\ln 1/T \left[ T - (V_R + KV_H + V_E) C_R \right]$  en fonction du temps, nous obtenons une droite dont la pente (b) est égale à :

$$b = - \frac{(V_E + KV_H + V_R)}{V_R (V_E + KV_H)} \cdot \frac{S_m D}{h_m} \quad (31)$$

Un raisonnement analogue peut être appliqué à l'équation (18).

Expérimentalement, il est possible d'évaluer séparément  $S_m D/h_m$  mais non  $S_i P_i$ .

Les équations exposées ne prennent pas en considération le rôle joué par la formation de micelles par addition de tensio-actifs dans la phase aqueuse de l'émulsion. Toutefois, en pratique, nous avons tenu compte de cet effet : le coefficient  $S_m D/h_m$  a été déterminé en procédant dans la même cellule à la dialyse de la solution de tensio-actif équivalant à la composition de la phase externe de l'émulsion.

Dans ce cas l'équation (26) se simplifie en

$$\ln \frac{1}{T} \left[ T - (V_E + V_R) C_R \right] = - \frac{V_E + V_R}{V_E V_R} \frac{S_m D}{h_m} \cdot t \quad (32)$$

Le terme  $S_m D/h_m$  représente le coefficient de perméabilité (P) de la membrane au soluté considéré dans les conditions définies; il est exprimé en  $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 2.3 *Choix et caractéristiques du traceur*

Toutes les émulsions préparées jusqu'à présent ne contenaient pas de principe actif. Ce dernier, qui joue dans notre travail le rôle de traceur permettant l'étude des processus de transport, doit présenter des caractéristiques physico-chimiques particulières; son choix a fait l'objet de quelques recherches préliminaires.

Des quelques exemples de travaux sur la libération à partir de systèmes émulsionnés cités dans le tableau 1, il ressort que les substances utilisées sont généralement des molécules très liposolubles, ayant un coefficient de partage huile/eau élevé, tout en présentant une certaine solubilité dans l'eau.

Notre choix s'est porté, dans un premier temps, sur des dérivés tels que les acides benzoïque, salicylique et sorbique; mais aucune de ces substances ne présentait des solubilités favorables à une telle étude. De plus, une liaison principe actif - polysorbate 80 aurait partiellement faussé les résultats. Nous avons également écarté les dérivés stéroïdiques en raison de leur solubilité trop faible dans les deux phases.

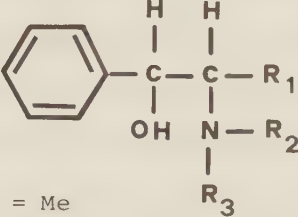
Nous avons ensuite examiné l'éphédrine et ses dérivés et trouvé dans cette série chimique des substances intéressantes pour le but recherché.

Les essais de diffusion qui suivront sont effectués avec l'étafédrine DCI (= éthyléphédrine) dont le tableau 11 résume les principales caractéristiques physico-chimiques.

Par la suite, nous étudierons plus brièvement une autre substance de la même série : la méthyléphédrine (tabl. 11). Précisons que le choix de ces substances est uniquement basé sur leurs propriétés physico-chimiques, sans tenir compte de leur action thérapeutique.

Tableau 11

Propriétés physico-chimiques de l'étafédrine  
et de la méthyléphédrine

|                                         | Etafédrine *                                                                                                                                                                                                                         | Méthyléphédrine                      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Structure chimique                      | <div style="text-align: center;">  <p> <math>R_1 = \text{Me}</math><br/> <math>R_2 = \text{Me}</math><br/> <math>R_3 = \text{Et}</math> </p> </div> |                                      |
| Poids moléculaire                       | 193,28                                                                                                                                                                                                                               | 179,25                               |
| Nom chimique                            | (N-méthyl éthylamino)-2 phényl-1 propanol-1                                                                                                                                                                                          | Phényl-1 diméthyl-2 amino-3 propanol |
| Solubilité dans l'eau [g/100 ml]        | 1,07 (30° C)                                                                                                                                                                                                                         | 0,76 (30° C)                         |
| Solubilité dans l'hexadécane [g/100 ml] | Presque infinie                                                                                                                                                                                                                      | 1,75 (30° C)                         |
| pK <sub>a</sub>                         | 9,75                                                                                                                                                                                                                                 | 9,30 <sup>92</sup>                   |
| Maximum d'absorption en UV [nm]         | 257                                                                                                                                                                                                                                  | 257                                  |

\* Nous remercions la maison Merrel Pharma, 608 Gross-Gerau (Allemagne), qui a aimablement mis ce produit à notre disposition.

### 2.3.1 Dosage de l'étafédrine

Selon le milieu de dissolution de l'étafédrine, nous avons utilisé les 3 méthodes de dosage suivantes :

- a) Par spectrophotométrie UV (Spectrophotomètre Perkin-Elmer 139) à 257 nm lorsque l'étafédrine est en solution aqueuse, en absence de polysorbate 80 ou en présence d'une concentration connue de ce tensio-actif.
- b) Dosage des bases azotées selon la Ph. Helv. VI lorsque le traceur est en solution aqueuse en présence d'une concentration inconnue de tensio-actif.
- c) Titration en milieu non aqueux<sup>93</sup> lorsque le solvant est l'hexadécane; rappelons que 1 P d'hexadécane est miscible à 2 P d'acide acétique 100%, 0,2 P d'anhydrique acétique et 1,2 P de chloroforme.

### 2.3.2 Remarques sur les coefficients de partage

Le coefficient de partage vrai K entre deux phases non miscibles est défini par

$$K = \frac{C_H}{C_E} \quad (33)$$

où K = coefficient de partage vrai lipide/eau

$C_H$  = concentration dans la phase lipidique

$C_E$  = concentration dans la phase aqueuse

A l'équilibre et à température constante, le rapport des deux concentrations est constant. Cette relation n'est valable que si plusieurs conditions sont respectées<sup>94, 95</sup> :

- a) Les deux phases sont non miscibles.
- b) La substance n'est ni associée ni dissociée dans l'une des deux phases.
- c) Les solutions sont relativement diluées.
- d) La substance présente une solubilité limitée dans les deux phases.

Puisqu'en pratique, toutes ces conditions ne sont jamais réunies, on mesure alors un coefficient de partage

apparent ( $K_{app}$ ), qui n'est valable que dans les conditions expérimentales où il a été déterminé.

L'examen des équations décrivant le processus de transport dans une émulsion (cf. 2.2) montre qu'il est nécessaire de connaître les valeurs des coefficients de partage dans le système étudié.

Le tableau 12 donne les coefficients de partage apparents déterminés dans deux conditions expérimentales différentes. Les mesures ont été effectuées après l'obtention de l'équilibre des concentrations dans les 2 phases agitées à 60 tpm, dans des béchers thermostatisés à 30° C.

Tableau 12

*Coefficients de partage de l'étafédrine  
(500  $\mu$ Mol/100 ml de phases)*

| Concentration<br>polysorbate 80<br>[% pds/vol] | $K_{app_1}^*$ | $K_{app_2}^{**}$ |
|------------------------------------------------|---------------|------------------|
| 0                                              | 3,2           | 7,5              |
| 1                                              | 2,5           | 4,8              |
| 5                                              | 0,9           | 2,1              |

\* Rapport du volume des phases H/E : 1/1

\*\* Rapport du volume des phases H/E : 1/9

Ces résultats permettent de formuler les remarques suivantes :

- Les coefficients de partage diminuent avec l'augmentation de la concentration en tensio-actif, ce qui est dû à un effet de solubilisation micellaire.
- Pour chaque concentration en tensio-actif, on observe des différences de valeurs provoquées par le rapport du volume des phases ( $K_{app2} > K_{app1}$ ).

De plus, pour ces essais, nous avons choisi une faible concentration en traceur pour respecter autant que possible les critères de conditions idéales de détermination du coefficient de partage. Dans les émulsions, nous utiliserons des concentrations supérieures qui représentent une autre cause de variation.

Pour ces trois raisons, il ressort qu'il s'avère indispensable de déterminer la valeur du coefficient de partage directement sur chaque émulsion avant de la soumettre à un essai de libération. Nous avons prouvé que l'équilibre est atteint dès la fin de la préparation de l'émulsion.

Pour éviter toute confusion, nous appellerons coefficient de partage effectif ( $K_{eff}$ ) la valeur propre à chaque système émulsionné. Le mode opératoire sera décrit au paragraphe 2.6.

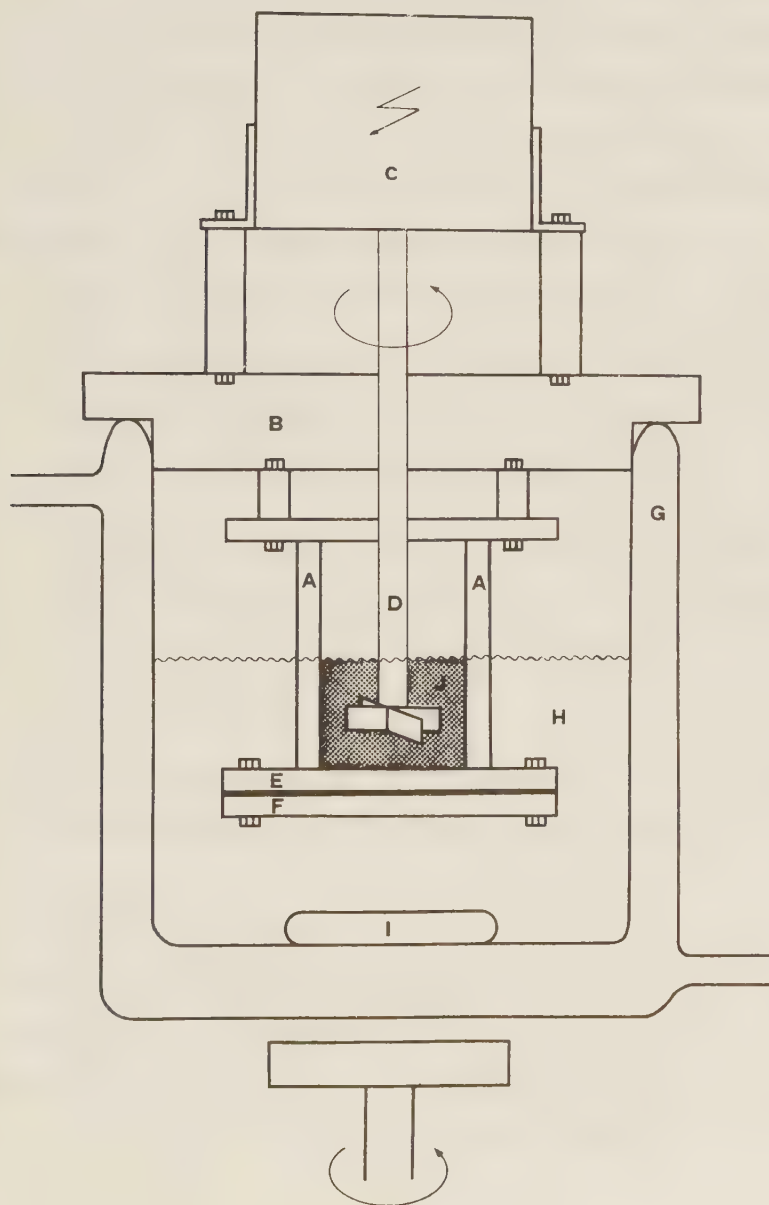
## 2.4 Description de la cellule de libération

Pour l'étude des phénomènes de transport à partir d'une émulsion, nous avons mis au point une cellule de diffusion (fig. 8).

La cellule proprement dite (A), en plexiglas, qui renferme l'émulsion, est vissée sur un couvercle en PVC (B). Un moteur asynchrone (C) (Crouzet, 100 tpm) fixé sur le couvercle et muni d'un agitateur (D) à pales, assure l'agitation à l'intérieur de la cellule. La membrane de cellophane (type PD 215 E.I. Du Pont de Nemours), traitée selon le mode opératoire décrit par *Doelker*<sup>96</sup>, est maintenue entre deux couronnes de plexiglas (préalablement enduites de silicone), l'une solidaire de la cellule (E), l'autre vissée à cette dernière (F). Le couvercle auquel la cellule et le moteur sont fixés, est posé sur un bēcher à double paroi (G) thermostatisé à  $30^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{ C}$ , qui contient le milieu récepteur (H). Ce dernier est agité au moyen d'un barreau magnétique (I) de 4 cm, à 300 tpm. Le système est réglé de façon à ce que le niveau de l'émulsion (J), contenue à l'intérieur de la cellule (20 ml) et celui du milieu récepteur (300 ml) coïncident.

Figure 8

*Schéma de la cellule de diffusion*



Le remplissage de la cellule et les prélèvements dans le milieu récepteur se font à travers deux ouvertures percées dans le couvercle.

La surface de la membrane en contact avec l'émulsion est de  $7,065 \text{ cm}^2$ .

### *Mode opératoire*

Les émulsions sont maintenues dans un bain thermostatisé à  $30^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{ C}$  jusqu'à ce qu'elles atteignent cette température. Le milieu récepteur, généralement de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie, est introduit dans les béchers thermostatisés; dès qu'il a atteint la température désirée, on y place la cellule, à laquelle on a préalablement fixé la membrane, en évitant la formation de bulles d'air; si elles se forment malgré les précautions prises, elles seront éliminées par aspiration au moyen d'une seringue munie d'une aiguille recourbée. L'émulsion est versée à l'aide d'une pipette et les dispositifs d'agitation sont immédiatement enclenchés. Généralement, on travaille avec 4 cellules ou plus en parallèle.

A des intervalles de temps fixés par l'expérience, des échantillons de 3 ml sont prélevés dans chaque compartiment récepteur, puis dosés directement par spectrophotométrie et réintroduits dans le milieu afin de ne pas changer les conditions expérimentales.

Pour contrôler la répartition du traceur dans l'émulsion, les mesures sont effectuées de l'autre côté de la membrane à des temps plus espacés, ainsi qu'en fin d'expérience afin d'établir un bilan. On arrête l'agitation dans l'une des cellules et on prélève la totalité de l'émulsion pour le dosage selon la méthode décrite plus loin. On poursuit l'expérience avec les cellules restantes de façon à ce qu'il en reste au moins deux en fin de diffusion.

Les remarques suivantes s'imposent :

- Notre modèle de diffusion est formé de deux compartiments de volumes inégaux pour assurer des "sink conditions" pendant toute l'expérience.
- L'eau est utilisée comme référence dans le dosage spectrophotométrique puisque les adjuvants ne traversent pas la membrane de cellophane pendant la durée de l'expérience.
- Un contrôle préalable de l'étanchéité de chaque cellule est effectué au moyen d'une solution de bleu de méthylène.
- Des essais préliminaires ont permis de choisir des vitesses d'agitation adéquates dans les deux compartiments de la cellule. Une vitesse de 100 tpm s'est révélée indispensable dans le compartiment supérieur

pour empêcher le crémage des émulsions, les vitesses de 30 et 60 tpm étant insuffisantes.

Dans le compartiment récepteur, des vitesses de 100 et 300 tpm peuvent être utilisées indifféremment. Nous avons adopté pour la suite de notre travail 300 tpm.

## 2.5 Mise en évidence d'une interaction éphédrine-membrane de cellophane

La possibilité d'une liaison principe actif-membrane de dialyse a été relevée par plusieurs auteurs<sup>97, 98</sup>. Jürgensen<sup>98</sup> fait à juste titre remarquer que, puisque la plupart des membranes sont composées de polyamides ou de cellulose, il faut s'attendre à une telle liaison. Ågren<sup>99</sup> propose une méthode de dialyse pour mettre en évidence ce phénomène avec des membranes de cellophane : il étudie la diffusion de plusieurs substances parmi lesquelles figure l'éphédrine. Il constate que lors de la dialyse du chlorure d'éphédrinium, la constante de vitesse est plus élevée lorsque le milieu récepteur est de l'eau, moins élevée si ce dernier est une solution aqueuse de NaCl 0,1 N. Par contre, si l'éphédrine base est dialysée, la constante de vitesse est pratiquement la même en présence de ces deux milieux récepteurs.

*Ågren* propose les explications suivantes :

- La vitesse de dialyse rapide de l'ion chlorure augmente la vitesse du contre-ion éphédrinium.
- Lorsque l'ion chlorure est présent des deux côtés de la membrane, la vitesse est due uniquement à l'ion éphédrinium.
- L'adjonction d'une charge positive à la molécule d'éphédrine en augmente le degré de solvatation et par conséquent la constante de vitesse de l'éphédrine base devrait être plus élevée que celle de l'ion éphédrinium. Puisque ce n'est pas le cas, *Ågren* conclut une faible interaction éphédrine base-membrane de cellophane.

#### 2.5.1 *Partie expérimentale*

D'après les considérations qui précèdent, nous devons nous attendre à un phénomène semblable avec l'étafédrine. De ce fait, nous avons étudié dans un premier temps la dialyse de l'étafédrine base et du chlorure à partir de solutions à  $2,5 \cdot 10^{-2}$  M en absence et en présence de tensio-actif (fig. 9 et 10).

Le tableau 13 résume les solutions utilisées ainsi que les valeurs expérimentales de la pente  $b$  donnée par l'équation (32) et du coefficient de perméabilité  $P$ .

Tableau 13

*Interaction étafédrine-membrane de cellophane*

| Traceur               | Adjuvants                                        | Milieu récepteur            | $b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] | $P \times 10^2$<br>[cm <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> ] |
|-----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Étafédrine base       | —                                                | H <sub>2</sub> O            | -1,952                                  | 3,659                                                    |
| Étafédrine base       | —                                                | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -2,125                                  | 3,985                                                    |
| Étafédrine base       | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M                      | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -2,624                                  | 4,920                                                    |
| Chlorure d'étafédrine | —                                                | H <sub>2</sub> O            | -2,775                                  | 5,203                                                    |
| Chlorure d'étafédrine | —                                                | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -2,483                                  | 4,656                                                    |
| Étafédrine base       | Polysorbate 80 1%                                | H <sub>2</sub> O            | -1,468                                  | 2,752                                                    |
| Étafédrine base       | Polysorbate 80 1%                                | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -1,751                                  | 3,283                                                    |
| Étafédrine base       | Polysorbate 80 1%<br>NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -1,739                                  | 3,261                                                    |
| Chlorure d'étafédrine | Polysorbate 80 1%                                | H <sub>2</sub> O            | -2,598                                  | 4,871                                                    |
| Chlorure d'étafédrine | Polysorbate 80 1%                                | NaCl 2,5·10 <sup>-2</sup> M | -2,614                                  | 4,901                                                    |

Figure 9

Interaction étafédrine - membrane de cellophane

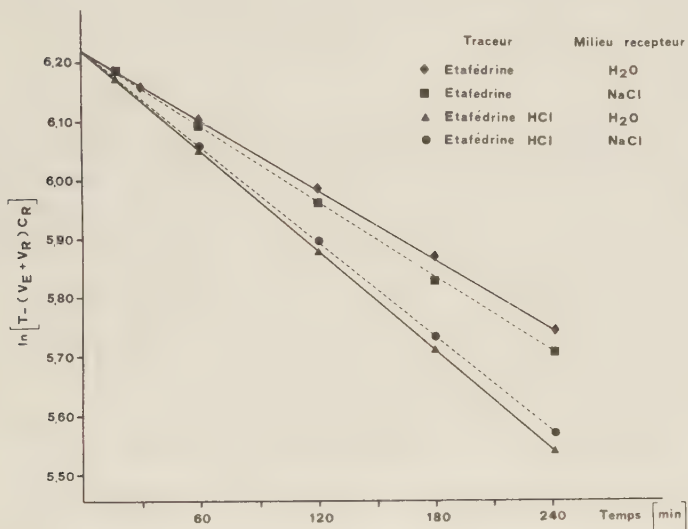
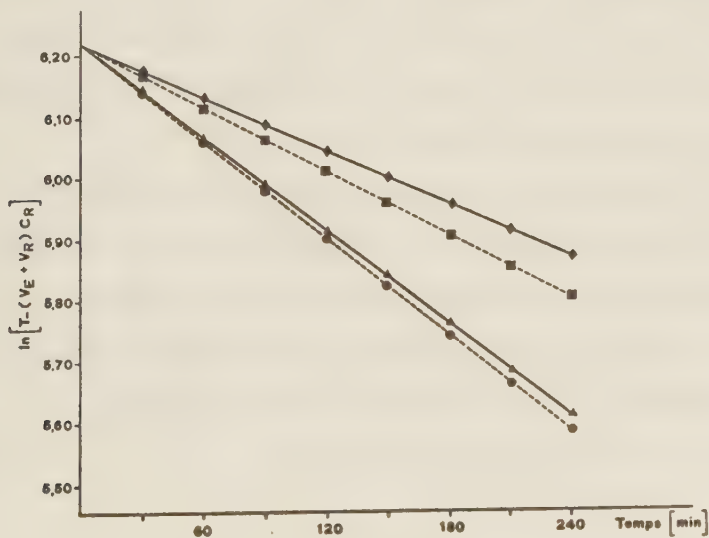


Figure 10<sup>\*</sup>

Interaction étafédrine + polysorbate 80 - membrane de cellophane



\* Pour les symboles se référer à la figure 9

De ce qui précède, on constate réellement une faible interaction étafédrine-membrane de cellophane, en accord avec Ågren, aussi bien en absence qu'en présence de polysorbate 80.

Il reste à savoir dans quelle mesure cette fixation est mesurable et peut gêner par la suite nos expériences.

Pour cela, nous avons effectué, dans une deuxième étape, un test complémentaire. Pour nous rapprocher des conditions expérimentales rencontrées dans les émulsions, nous avons préparé différentes solutions aqueuses à  $5,74 \cdot 10^{-3}$  M d'étafédrine et contenant des concentrations croissantes de polysorbate 80 (de 0,1% à 5%). Dans chaque solution, nous avons introduit une membrane de cellophane de surface connue. Toutes les solutions sont agitées et à différents intervalles de temps (0, 30', 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h et 24 h), la concentration en principe actif est contrôlée. Dans aucun cas nous n'avons observé une diminution de la concentration de l'étafédrine.

Nous pouvons donc conclure que si une faible fixation étafédrine-membrane de cellophane existe, elle ne saura être décelée dans nos conditions expérimentales et ne pourra pas gêner la suite du travail; elle sera volontairement négligée d'autant plus qu'un effet similaire se manifestera dans chaque expérience réalisée.

## 2.6 Contrôle de la répartition du traceur dans l'émulsion

Dans le but de suivre la répartition du traceur au sein de l'émulsion au cours du temps, nous avons mis au point une méthode de séparation de la phase aqueuse. En effet, pratiquement, il n'a pas été possible d'isoler la phase huileuse. En conséquence, la concentration dans l'hexadécane est déduite de l'équation de bilan (15'). Le coefficient de partage effectif, utilisé dans nos simulations ultérieures de transport sera calculé à partir de ces données.

### *Mode opératoire*

20 ml de l'émulsion dans laquelle le traceur a été préalablement dissous dans la phase huileuse sont prélevés hors de la cellule de diffusion et soumis à une centrifugation (centrifugeuse WKF G50K, généralement 15 minutes à 15.000 tpm). Le surnageant est éliminé par aspiration et la phase aqueuse restante filtrée sur Millipore ( $\varnothing$  0,22  $\mu$ m). L'étafédrine est dosée dans le filtrat selon la méthode 2 b (cf. 2.3.1). Cette technique permet l'obtention d'un filtrat aqueux propre au dosage titrimétrique.

Nos propres essais appellent les deux remarques suivantes :

- Contrairement aux observations de *Goldberg*<sup>100</sup>, la filtration directe de l'émulsion provoque une obstruction du filtre.
- Un dosage spectrophotométrique du filtrat s'est révélé impossible, le blanc obtenu en traitant une émulsion témoin sans traceur ne présentant pas une reproductibilité suffisante dans les valeurs d'extinction.

## 2.7 Schéma expérimental général

Chaque lot d'émulsions, fabriqué selon le mode opératoire décrit précédemment (cf. 1.5.2) fait l'objet de deux contrôles avant toute expérience de diffusion :

- a) Analyse granulométrique (cf. 1ère partie) dans le but d'évaluer la surface interne spécifique ( $S_{int}$ ).
- b) Contrôle de la répartition du traceur immédiatement après fabrication (cf. 2.6), permettant la détermination de la concentration dans la phase aqueuse au temps 0 ( $C_E$ ), nécessaire pour le calcul du coefficient de partage ( $K_{eff}$ ).

L'émulsion ainsi caractérisée, est alors soumise à l'étude de transport (cf. 2.4). Précisons que généralement 4 cellules de diffusion sont utilisées en parallèle, et que

les diffusions sont poursuivies habituellement pendant 6 heures. Les mesures dans le compartiment récepteur, effectuées toutes les 30 minutes, permettent la détermination de la concentration ( $C_R$ ) du traceur diffusé, alors que la détermination de la concentration dans la phase aqueuse ( $C_E$ ) n'est effectuée qu'à des intervalles de temps plus espacés (deux heures), ainsi qu'en fin d'expérience. Pour cette dernière opération, il est nécessaire d'interrompre des expériences en cours. La diffusion est poursuivie sur les cellules restantes.

On peut donc constater que les paramètres  $S_{int}$ ,  $K_{eff}$ ,  $C_E$  et  $C_R$  sont déterminés sur le même lot d'émulsions.  $C_H$ , ne pouvant pas être déterminé expérimentalement, est déduit par calcul (cf. 2.6).

Le terme  $P = S_m D / h_m$  est obtenu en procédant dans la même cellule à la dialyse d'une solution aqueuse de tensio-actif, équivalant à la composition de la phase externe de l'émulsion (cf. 2.2.2). Cette valeur sera utilisée pour toutes les émulsions contenant le même pourcentage en tensio-actif.

Ainsi, nous disposons de toutes les valeurs nécessaires pour caractériser le type de transport.

## *2.8 Reproductibilité des résultats de libération*

Avant d'étudier le type de transport et l'influence de différents paramètres sur la vitesse de libération, nous avons testé la reproductibilité de la diffusion d'une cellule à l'autre, puis d'un lot d'émulsions à l'autre. Pour ces tests, nous avons considéré les pentes des droites exprimant la quantité libérée en fonction du temps, après avoir démontré statistiquement la linéarité sur les trois premières heures d'expérience.

### *2.8.1 Différence entre les cellules de diffusion*

Dans quatre cellules, nous avons suivi la libération de l'étafédrine à partir d'une solution aqueuse à  $2,5 \cdot 10^{-2}$  M, afin d'éviter d'éventuelles différences dues à l'émulsion elle-même.

Tableau 14

Reproductibilité d'une cellule à l'autre de la libération  
du traceur à partir d'une solution  
(Test de parallélisme)

| Cellule | Pente<br>[ $\mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ] | $F_{\text{calc}}$ | $F_{0,05}^{(3,12)}$ |
|---------|----------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 1       | $7,359 \cdot 10^{-1}$                              | 0,28              | 3,49                |
| 2       | $7,563 \cdot 10^{-1}$                              |                   |                     |
| 3       | $7,526 \cdot 10^{-1}$                              |                   |                     |
| 4       | $7,574 \cdot 10^{-1}$                              |                   |                     |

Les quatre droites peuvent être considérées  
comme parallèles puisque

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{table}} \text{ pour } P = 0,05$$

Par conséquent, les quatre cellules présentent  
des caractéristiques identiques et seront utilisées indif-  
féremment.

Puis, nous avons étudié la libération de l'éta-  
fédrine à partir d'une même émulsion répartie dans trois  
cellules.

Tableau 15

*Reproductibilité d'une cellule à l'autre de la libération  
du traceur à partir d'une même émulsion  
(Test de parallélisme)*

| Cellule | Pente<br>[ $\mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ] | $F_{\text{calc}}$ | $F_{0,05}^{(2,9)}$ |
|---------|----------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| 1       | $7,966 \cdot 10^{-1}$                              | 2,40              | 4,25               |
| 2       | $7,872 \cdot 10^{-1}$                              |                   |                    |
| 3       | $7,603 \cdot 10^{-1}$                              |                   |                    |

Nous constatons donc que la vitesse de libération, dans le cas des émulsions, est la même quelle que soit la cellule utilisée. Nous disposons ainsi d'un appareillage adéquat pour l'étude envisagée.

*2.8.2 Reproductibilité de la diffusion entre émulsions  
de même formule mais provenant de lots différents*

Nous avons comparé la diffusion de 3 émulsions de formule identique, mais de lots de fabrication différents.

Tableau 16

*Reproductibilité de la libération du traceur à partir  
de 3 lots d'une même formule d'émulsion  
(Test de parallélisme)*

| Lot | Pente<br>[ $\mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ] | $F_{\text{calc}}$ | $F_{0,05}^{(2,12)}$ |
|-----|----------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 1   | $9,096 \cdot 10^{-1*}$                             | 3,86              | 3,88                |
| 2   | $8,830 \cdot 10^{-1*}$                             |                   |                     |
| 3   | $8,586 \cdot 10^{-1*}$                             |                   |                     |

\* Les pentes plus élevées que celles relevées dans le tableau précédent sont dues, pour cette expérience, à l'utilisation d'un autre lot de membranes.

La diffusion est donc reproductible; nous l'étudierons dorénavant, à partir d'un seul lot réparti dans 2 ou plusieurs cellules. Pour chaque intervalle de temps, le pourcentage libéré sera calculé à partir de la moyenne.

## 2.9 Détermination pratique du type de transport

L'examen des équations (18) et (26), qui décrivent mathématiquement la vitesse de transport respectivement en présence et en absence d'une barrière interfaciale, montre qu'elles ne diffèrent que par les termes définissant la perméabilité ( $S_i P_i$  et  $S_m D/h_m$ ) et le coefficient de partage ( $K'$  et  $K$ ).

De plus, la surface de l'interface huile/eau ( $S_i$ ) n'intervient pas dans l'équation qui décrit le transport en absence d'une barrière interfaciale (éq. 26), et ne joue donc pas de rôle, dans ce cas, sur la vitesse de diffusion. Puisque  $S_m D/h_m \ll S_i P_i$ , le transport à l'interface est quasi instantané ( $C_i \approx C_E$  et  $C_E \neq C_R$ ).

Une autre méthode permettant de discerner l'étape contrôlant la libération, consiste à simuler cette dernière en substituant les valeurs des différents paramètres dans l'équation (26) et à vérifier l'exactitude de l'ajustement.

Par contre, la libération peut être plus difficilement simulée dans le cas d'une barrière interfaciale à l'aide de la formule (18), car la détermination du terme  $S_i P_i$  est pratiquement irréalisable.

En résumé, on dispose de trois méthodes permettant de caractériser le transport d'un traceur à partir d'une émulsion H/E en absence d'une barrière interfaciale :

- a) Contrôle du transport à l'interface; il doit être quasi instantané.
- b) Mise en évidence du rôle de la surface interfaciale; elle ne doit pas influencer la libération.
- c) Simulation de la diffusion, en remplaçant les différents paramètres par leurs valeurs dans l'équation (26).

*a) Contrôle du transport à l'interface*

Des essais ont montré que l'étafédrine, incorporée dans l'hexadécane se partage entre les deux phases de l'émulsion lors de sa fabrication et atteint dès ce moment l'équilibre. De plus, dans notre modèle expérimental, ce partage n'est pas influencé par le mode d'incorporation du traceur; dans les expériences qui suivront, ce dernier sera toujours dissous dans la phase interne.

*b) Rôle de la surface de l'interface H/E*

Pour vérifier si la surface interfaciale influence ou non la diffusion de l'étafédrine, nous avons étudié sa libération à partir de trois émulsions, de formule identique, mais de surfaces internes spécifiques suffisamment différentes. Ces dernières ont été obtenues en jouant sur la vitesse et le temps d'agitation de l'homogénéisateur (tabl. 17).

Tableau 17

*Conditions de préparation et surface interne spécifique  
des émulsions*

| Emulsion * | $S_{int}$<br>[cm <sup>2</sup> ·cm <sup>-3</sup> ] | Vitesse<br>d'agitation<br>[tpm] | Temps<br>d'agitation<br>[min] |
|------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| A          | 1517,4                                            | 10.000                          | 5                             |
| B          | 847,5                                             | 6.000                           | 3                             |
| C          | 362,4                                             | 6.000                           | 1                             |

\* Etafédrine  $2,5 \cdot 10^{-2}$  Mol/l, hexadécane 10 ml,  
solution de polysorbate 80 1% 90 ml.

Comme au paragraphe 2.8, nous avons considéré  
pour les tests statistiques les pentes exprimant la quantité  
libérée en fonction du temps (tabl. 18).

Tableau 18

*Tests de linéarité et de parallélisme*

| Emulsion | Linéarité                               |                   |                  | Parallélisme      |                   |
|----------|-----------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|          | Pente b<br>[ $\mu\text{Mol min}^{-1}$ ] | $F_{\text{calc}}$ | $F_{0,05}^{4,6}$ | $F_{\text{calc}}$ | $F_{0,05}^{2,30}$ |
| A        | 0,4257                                  | 0,81              | 4,53             | 1,53              | 3,31              |
| B        | 0,4190                                  | 0,58              | 4,53             |                   |                   |
| C        | 0,4101                                  | 2,44              | 4,53             |                   |                   |

Il ressort de ces résultats que la surface interfaciale n'influence pas significativement la vitesse de libération.

Ces deux premières constatations nous autorisent à penser que nous sommes en présence d'un transport sans barrière interfaciale et à tenter une simulation au paragraphe suivant.

c) *Simulation du transport*

Voici à titre comparatif les résultats expérimentaux et les valeurs simulées par ordinateur pour le milieu de libération, la phase aqueuse et la phase huileuse (fig.11) concernant l'émulsion B du tableau 17. Le pourcentage en traceur dans chaque phase est calculé au moyen des équations (28, 29 et 30) pour

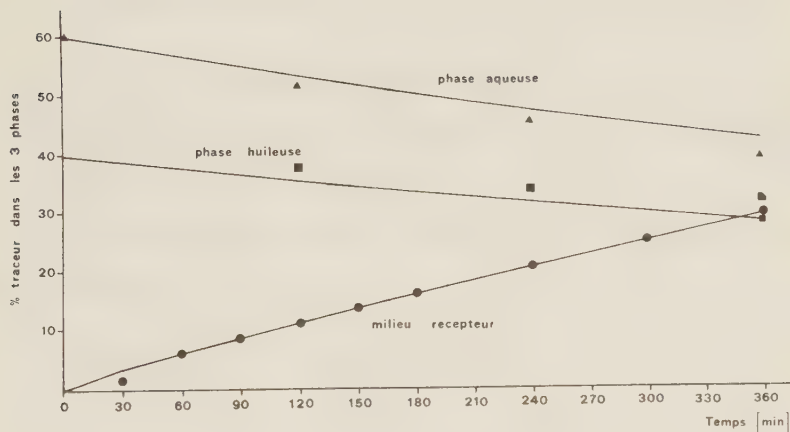
$$P = 2,934 \cdot 10^{-2} \text{ [cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}] \text{ et } K_{\text{eff}} = 6,0$$

Remarques

Pour des raisons pratiques, il est difficile d'obtenir plus de 4 points expérimentaux pour la phase aqueuse (et par conséquent pour la phase huileuse).

Figure 11

Résultats expérimentaux et courbes simulées pour les 3 phases  
(Emulsion B)



Les courbes représentent les simulations alors  
que les symboles correspondent aux points expérimentaux.

Le tableau 19 compare les valeurs des pentes expérimentales (cf. 2.2.2) et simulées des 3 émulsions testées.

Tableau 19

*Comparaison des pentes expérimentales et simulées*

| Emulsion | $K_{\text{eff}}$ | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>$[\text{min}^{-1}]$ | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>$[\text{min}^{-1}]$ |
|----------|------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| A        | 5,9              | -1,030                                                           | -1,082                                                     |
| B        | 6,0              | -1,025                                                           | -1,076                                                     |
| C        | 5,2              | -1,023                                                           | -1,134                                                     |

La bonne concordance entre les valeurs expérimentales et simulées confirme que les équations (26, 27 et 28) permettent de décrire ce processus de transport.

La présence d'un émulsateur à l'interface, en particulier du polysorbate 80, n'est pas susceptible de créer une barrière suffisamment rigide qui contrôlerait le transport de la phase huileuse à la phase aqueuse et qui retarderait donc la libération du traceur.

## 2.10 Résumé et conclusions

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons décrit deux modèles mathématiques de cinétique de libération, l'un en présence et l'autre en absence de barrière interfaciale.

Nous avons mis au point une cellule de diffusion pour tester la libération de l'étafédrine à partir de l'émulsion modèle.

Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

- L'appareillage utilisé est adéquat pour une étude de ce genre et permet d'obtenir des mesures reproductibles.
- La diffusion est reproductible d'un lot de libération à l'autre pour des émulsions de formule identique.
- Le type de transport de l'étafédrine, à partir du modèle considéré, est caractérisé par l'absence d'une barrière interfaciale, comme le prouvent les résultats obtenus avec des émulsions présentant des surfaces interfaciales différentes et les essais de simulation.

### 3. Etude de quelques paramètres influençant le transport d'un traceur dans une émulsion H/E

#### 3.1 Introduction

Après la mise au point du modèle de libération et la détermination du type de transport observé, nous nous proposons d'étudier l'importance relative de quelques paramètres de formulation sur la vitesse de libération d'un traceur incorporé dans le modèle considéré.

Auparavant, nous avons déterminé séparément tous les coefficients de perméabilité correspondant aux conditions expérimentales rencontrées plus loin. Nous présentons ces valeurs dans un premier chapitre en vue de les comparer. Les valeurs des coefficients de partage effectifs seront données ultérieurement pour chaque formule.

En technologie des émulsions, il est courant de faire varier les paramètres suivants :

- rapport des volumes des phases
- concentration en tensio-actif
- nature du tensio-actif
- valeurs HLB

Par ailleurs, nous avons également modifié la concentration en traceur et étudié le transport d'une substance chimiquement proche de l'étafédrine, mais de propriétés physiques assez différentes.

Enfin, nous examinerons si le modèle de transport décrit reste valable dans ces nouvelles conditions.

### 3.2 Valeurs des coefficients de perméabilité

Les coefficients de perméabilité définis au paragraphe 2.2.2 ainsi que les différents paramètres statistiques ont été calculés pour chaque condition expérimentale au moyen de l'ordinateur CDC 3800 du Centre cantonal genevois d'informatique (langage Fortran) et sont cités dans le tableau 20. Les valeurs sont déterminées sur un intervalle de diffusion de 3 heures.

Tableau 20

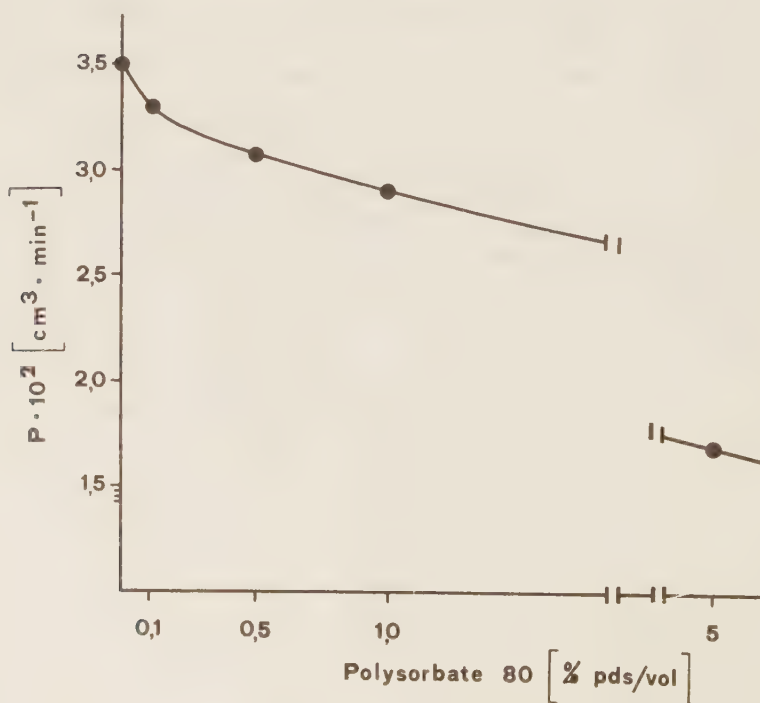
Coefficients de perméabilité de l'étafédrine  $5 \cdot 10^{-2}$  M

| Concentration<br>polysorbate 80<br>[ % pds/vol ] | $b \times 10^3 \text{ } (+ S_b \times 10^3)$<br>[min <sup>-1</sup> ] | $P \times 10^2$<br>[cm <sup>3</sup> ·min <sup>-1</sup> ] |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| —                                                | -1,864 ± 0,031                                                       | 3,496                                                    |
| 0,1                                              | -1,778 ± 0,021                                                       | 3,335                                                    |
| 0,5                                              | -1,653 ± 0,025                                                       | 3,101                                                    |
| 1,0                                              | -1,565 ± 0,021                                                       | 2,934                                                    |
| 5,0                                              | -0,920 ± 0,008                                                       | 1,725                                                    |

On constate que le coefficient de perméabilité diminue avec l'augmentation de la concentration en polysorbate 80 (fig. 12). La présence de ce tensio-actif dans la solution freine le passage de l'étafédrine à travers la membrane de cellophane pour toutes les concentrations utilisées. Cet effet doit être attribué à la formation de micelles : la totalité du traceur se trouve ainsi partagée entre la phase micellaire (= traceur lié) et la phase aqueuse (= traceur libre).

Figure 12

*Influence de la concentration en polysorbate 80 sur les coefficients de perméabilité de l'étafédrine*



Ces résultats sont en accord avec les observations de plusieurs auteurs pour d'autres principes actifs et émulseurs<sup>101-104</sup>.

Il faut encore préciser que l'on travaille à des concentrations en polysorbate 80 largement supérieures à la concentration micellaire critique de ce tensio-actif (CMC  $\approx$  0,01%)<sup>105</sup>.

### 3.3 Influence de la concentration en traceur

Nous nous proposons de vérifier si la relation (26) est suivie lorsque la concentration en étafédrine dans deux émulsions de formule identique est modifiée (tabl. 21).

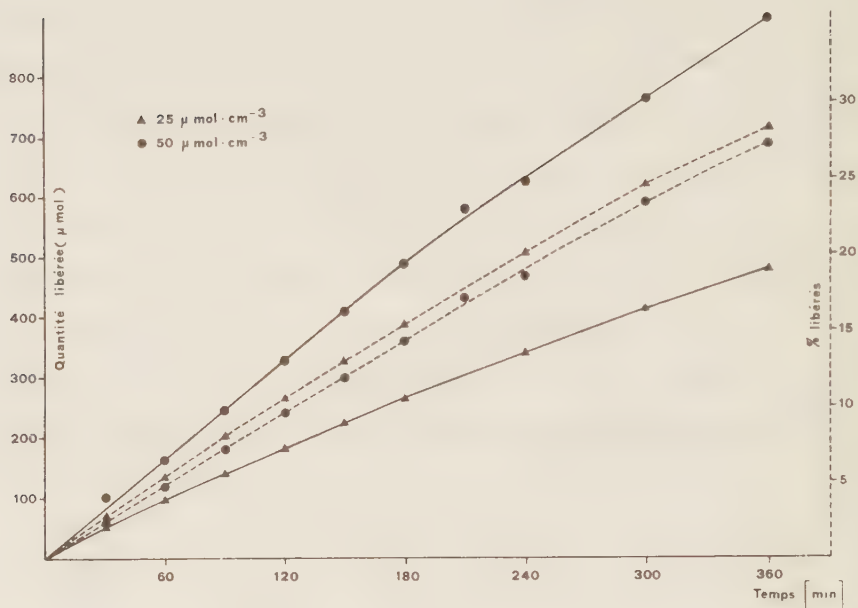
Tableau 21

*Influence de la concentration en traceur*

| Formule | Concentration<br>en traceur<br>[ $\mu\text{Mol/l}$ ] | $P \times 10^2$<br>[ $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ] | $K_{\text{eff}}$ | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>[ $\text{min}^{-1}$ ] | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>[ $\text{min}^{-1}$ ] |
|---------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| A       | 25000                                                | 3,011                                                      | 5,9              | -1,030                                                             | -1,082                                                       |
| B       | 50000                                                | 2,934                                                      | 6,4              | -0,979                                                             | -1,050                                                       |

Figure 13

*Influence de la concentration en traceur sur la libération*



On constate une bonne concordance entre les valeurs des pentes expérimentales et simulées pour les deux concentrations.

D'autre part, l'examen des équations de transport (27 et 28) montre que si le pourcentage libéré ne dépend pas de la quantité totale de traceur en jeu, la concentration du milieu récepteur doit varier (fig. 13). Les courbes de la figure 13 représentent les simulations, alors que les symboles correspondent aux valeurs expérimentales.

Les faibles différences de libération observées entre les deux émulsions s'expliquent par les valeurs légèrement différentes des coefficients de perméabilité et de partage, provoquées par l'effet de la concentration<sup>106</sup>.

### 3.4 Influence du rapport des volumes des phases

L'examen des équations décrivant le transport en absence d'une barrière interfaciale (éq. 26 à 28), montre qu'une augmentation du volume de la phase interne de l'émulsion ( $V_H$ ) entraîne un ralentissement de la diffusion.

Nous avons voulu le déterminer expérimentalement en étudiant la libération de l'étafédrine à partir de trois émulsions possédant un rapport de phases différent (tabl. 22).

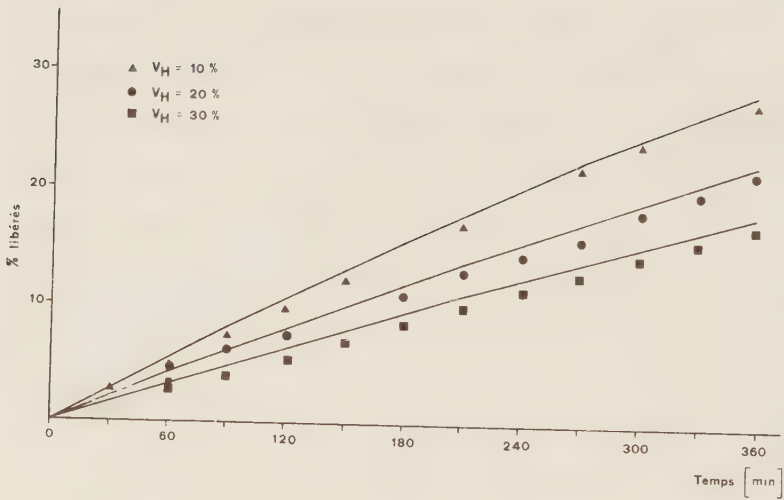
Tableau 22  
Formules et résultats

| Formule * | Hexadécane<br>[ml] | Solution aqueuse<br>1% polysorbate 80<br>[ml] | $K_{eff}$ | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] |
|-----------|--------------------|-----------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A         | 10                 | 90                                            | 6,4       | -0,979                                                            | -1,050                                                      |
| B         | 20                 | 80                                            | 6,1       | -0,736                                                            | -0,854                                                      |
| C         | 30                 | 70                                            | 6,4       | -0,632                                                            | -0,657                                                      |

\* Etafédrine  $5 \cdot 10^{-2}$  Mol/l;  $P = 2,934 \cdot 10^{-2}$  [cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>]

Figure 14

*Influence du rapport des volumes des phases  
sur la libération*



Comme on peut le constater, les calculs confirment l'ordre des vitesses de libération attendu :

A > B > C.

### *3.5 Influence de la concentration en polysorbate 80 sur la vitesse de transport de l'étafédrine*

Le choix d'un émulateur et de sa concentration est important et se fait en fonction de différents critères (type d'émulsion, valeur HLB, rapport du volume des phases, nature des phases et du principe actif, etc.)<sup>58,107-113</sup>. Une stabilité optimale peut être obtenue par une concentration adéquate en tensio-actif.

En théorie, pour chaque dispersion, il serait possible de calculer la quantité nécessaire d'émulateur afin que toutes les gouttelettes soient entourées d'un film monomoléculaire : cependant, dans la pratique, il est courant de déterminer les conditions optimales en faisant varier empiriquement la concentration. Nous nous proposons donc de modifier la teneur en polysorbate 80 dans le modèle expérimental adopté et d'observer si une forte concentration de ce tensio-actif est susceptible de créer une résistance au transport.

Précisons qu'une augmentation de la concentration du surfactif entraîne une augmentation de la surface interne spécifique, qui n'influence pas le type de transport ainsi que nous l'avons remarqué auparavant.

Tableau 23

*Influence de la concentration en polysorbate 80*

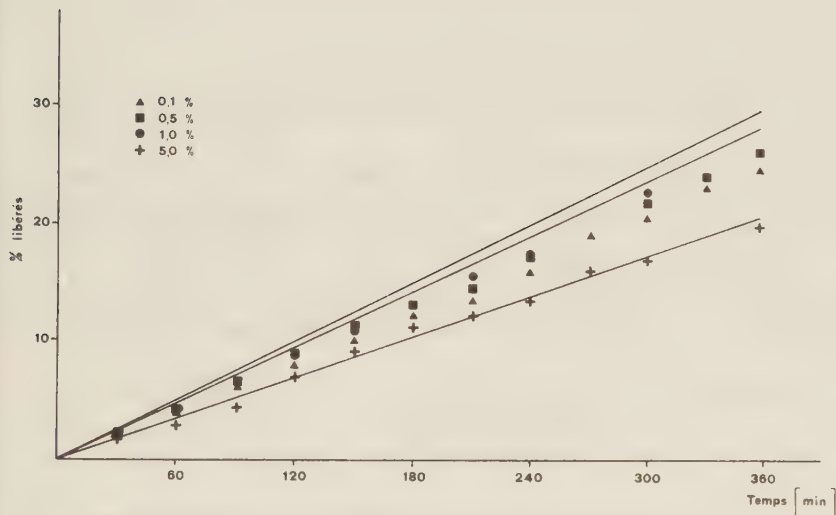
| Formule * | Concentration<br>polysorbate 80<br>[% pds/vol] | $S_{int}$<br>[cm <sup>2</sup> ·cm <sup>-3</sup> ] | $K_{eff}$ | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] |
|-----------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A         | 0,1                                            | 875,5                                             | 8,5       | -0,911                                                            | -1,062                                                      |
| B         | 0,5                                            | 1261,9                                            | 6,4       | -0,942                                                            | -1,110                                                      |
| C         | 1,0                                            | 1498,7                                            | 6,4       | -0,979                                                            | -1,050                                                      |
| D         | 5,0                                            | 2246,2                                            | 4,2       | -0,714                                                            | -0,711                                                      |

\* Etafédrine  $5 \cdot 10^{-2}$  Mol/l, hexadécane 10% vol.

La comparaison entre les pentes expérimentales et les valeurs correspondantes des pentes simulées (tabl. 23 et fig. 15) indique que l'émulgateur, à ces concentrations, ne forme pas une barrière interfaciale capable de freiner le transport. Les différences observées en fonction de la concentration en émulgateur s'expliquent par la variation des coefficients de perméabilité (cf. 3.2).

Figure 15

*Influence de la concentration en polysorbate 80  
sur la libération*



### 3.6 Influence de la nature du traceur

Dans le but de mettre en évidence le rôle des solubilités du traceur dans les deux phases, nous avons choisi un homologue inférieur de l'étafédrine, la méthyléphédrine, dont les caractéristiques physico-chimiques figurent au tableau 11. Ce traceur nous a paru intéressant en raison

de sa solubilité limitée dans l'hexadécane comparée à celle de l'étafédrine. Dans l'eau, ces deux substances présentent une solubilité voisine.

A titre comparatif, nous rappelons dans le tableau 24 les solubilités des deux dérivés.

Tableau 24

*Solubilités de l'étafédrine et de la méthyléphédrine*

| Traceur         | Solubilité H <sub>2</sub> O<br>[g/100 ml] | Solubilité hexadécane<br>[g/100 ml] |
|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| Etafédrine      | 1,06 (30° C)                              | Presque infinie                     |
| Méthyléphédrine | 0,76 (30° C)                              | 1,75 (30° C)                        |

Les coefficients de perméabilité légèrement plus élevés pour la méthyléphédrine s'expliquent par le poids moléculaire plus faible de cette substance (tabl. 25)<sup>114,115</sup>.

Tableau 25

*Coefficients de perméabilité comparés de l'étafédrine  
et de la méthyléphédrine ( $6 \cdot 10^{-3}$  M)*

| Traceur         | Concentration<br>polysorbate 80<br>[% pds/vol] | Pente (+ écart-type)<br>$b \times 10^3$ ( $\pm S_b \times 10^3$ )<br>[min <sup>-1</sup> ] | $P \times 10^2$<br>[cm <sup>3</sup> ·min <sup>-1</sup> ] |
|-----------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Méthyléphédrine | 0,2                                            | $-2,216 \pm 0,026$                                                                        | 4,155                                                    |
| Etafédrine      | 0,2                                            | $-2,158 \pm 0,042$                                                                        | 4,047                                                    |
| Méthyléphédrine | 1,0                                            | $-2,064 \pm 0,042$                                                                        | 3,869                                                    |
| Etafédrine      | 1,0                                            | $-1,996 \pm 0,022$                                                                        | 3,742                                                    |

Tableau 26

*Influence de la nature du traceur*

| Formule | Traceur *       | Conc. solution<br>polysorbate 80<br>[% pds/vol] | $K_{eff}$ | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] |
|---------|-----------------|-------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A       | Méthyléphédrine | 0,2                                             | 1,1       | - 1,883                                                           | -2,195                                                      |
| B       | Etafédrine      | 0,2                                             | 3,4       | - 1,364                                                           | -1,765                                                      |
| C       | Méthyléphédrine | 1,0                                             | 1,2       | - 1,602                                                           | -2,025                                                      |
| D       | Etafédrine      | 1,0                                             | 3,8       | - 1,326                                                           | -1,581                                                      |

\*  $6 \cdot 10^{-3}$  Mol/l

Figure 16

*Influence de la nature du traceur sur la libération*  
(Emulsion à 0,2% de polysorbate 80)

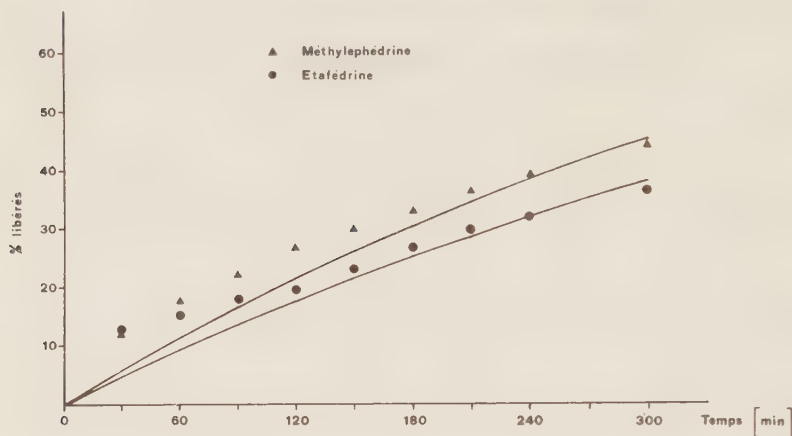
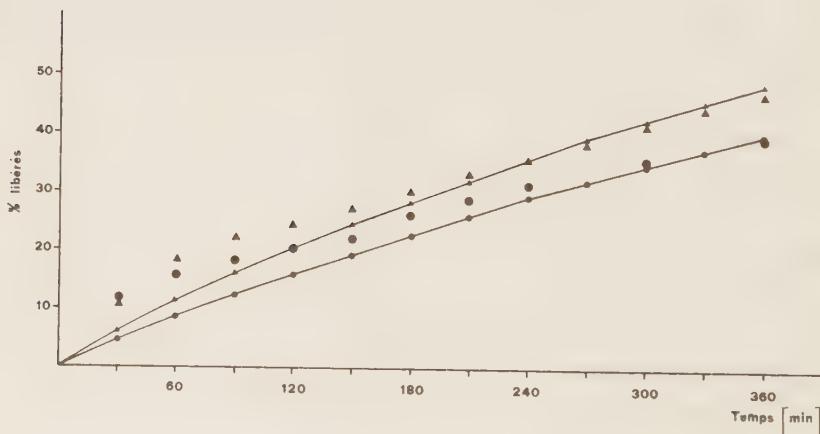


Figure 17\*

*Influence de la nature du traceur sur la libération*  
(Emulsion à 1% de polysorbate 80)



\* Pour les symboles se référer à la figure 16

Du tableau 26, il ressort que la concordance entre pentes expérimentales et pentes simulées est moins bonne que dans tous les autres cas examinés précédemment.

Il faut néanmoins préciser que la faible solubilité de la méthyléphédrine dans l'hexadécane nous a contraint à travailler avec des concentrations presque dix fois inférieures aux concentrations habituelles. Les quantités diffusées en début d'expériences sont donc également très peu élevées, ce qui entraîne d'inévitables imprécisions de lecture au spectrophotomètre.

On constate cependant, comme on pouvait s'y attendre, que la méthyléphédrine, de  $K_{\text{eff}}$  inférieur à celui de l'étafédrine, diffuse plus rapidement que son homologue supérieur; ceci est valable pour les deux concentrations en tensio-actif.

### *3.7 Influence de la présence d'un émulateur complexe et de la valeur HLB*

Le recours à un émulateur complexe formé d'un couple d'émulateurs hydrophile et lipophile permet très souvent d'améliorer les conditions de stabilité d'un système émulsionné.

Le choix des proportions des deux émulateurs dépend donc du type d'émulsion recherché et de la nature de

la phase lipidique. Pour chaque huile, il existe une valeur optimale de ce mélange pour obtenir l'émulsion la plus stable (valeur HLB critique)<sup>116-121</sup>.

Rares sont les études consacrées à l'influence de cette valeur HLB sur la libération de médicaments<sup>20,122,124</sup>. Waggoner et Fincher<sup>20</sup>, par exemple, constatent que la libération *in vitro* de l'éphédrine s'accélère avec une valeur de HLB passant de 10 à 14,9.

Lin<sup>124</sup> a poursuivi ce travail avec des expériences *in vivo* et a tenté d'établir des corrélations avec les essais précédents.

Dans le cadre de ce travail, nous n'avons pas recherché la valeur HLB critique du modèle d'émulsion; nous avons ajouté un émulateur lipophile (Span 80) au système dans le but d'observer une éventuelle résistance interfaciale à la diffusion à la suite de la formation d'un émulateur complexe.

Nous avons limité nos investigations dans ce domaine à la préparation d'une série d'émulsions (de valeurs HLB comprises entre 8 et 12), pour une concentration totale en émulateurs de 2% et une proportion d'hexadécane de 10% en volume. Précisons encore que l'émulateur lipophile est toujours dissous dans la phase interne.

Tableau 27

*Influence de la présence d'un émulateur complexe*

| Formule * | HLB | $K_{\text{eff}}$ | $P \times 10^2$<br>[cm <sup>3</sup> ·min <sup>-1</sup> ] | Pente<br>expérimentale<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] | Pente<br>simulée<br>$b \times 10^3$<br>[min <sup>-1</sup> ] |
|-----------|-----|------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A         | 8   | 9,1              | 3,010                                                    | -0,803                                                            | -0,931                                                      |
| B         | 10  | 6,6              | 2,790                                                    | -0,738                                                            | -0,987                                                      |
| C         | 12  | 6,1              | 2,610                                                    | -1,050                                                            | -0,946                                                      |

\* Etafédrine  $5 \cdot 10^{-2}$  Mol/l

La concordance des valeurs des pentes simulées et expérimentales (tabl. 27) indique que la présence d'un émulateur complexe ne change pas le type de transport dans l'émulsion.

L'influence de la valeur HLB a lieu au travers du coefficient de partage effectif. Ce dernier diminue avec une augmentation de la proportion en polysorbate 80, par un processus de solubilisation micellaire.

Tableau 28

*Proportions des émulateurs pour les différentes valeurs HLB*

| HLB | % Polysorbate 80 <sup>*</sup> | % Span 80 <sup>**</sup> |
|-----|-------------------------------|-------------------------|
| 8   | 34,6                          | 65,4                    |
| 10  | 53,3                          | 46,7                    |
| 12  | 72,0                          | 28,0                    |

<sup>\*</sup> HLB = 15,0

<sup>\*\*</sup> HLB = 4,3

### 3.8 Conclusions

Les résultats obtenus en faisant varier certains paramètres de formulation montrent que le type de transport demeure inchangé. L'emploi d'émulateurs conventionnels ne suffit pas à créer une barrière de nature à présenter une résistance au passage du traceur de la phase huileuse à la phase aqueuse.

Les différences de vitesse de libération constatées s'expliquent par la variation des valeurs des coefficients de partage effectifs et de perméabilité. A cet égard, la quantité d'émulateur hydrophile joue un rôle particulier par l'effet de solubilisation micellaire.

Les différences de libération constatées s'expliquent par la variation de la quantité et de la nature du traceur. Faire varier le rapport des volumes des phases, la concentration en traceur ainsi que la proportion d'émulgateur constitue un moyen de diriger *in vitro* la libération d'un principe actif.

#### 4. Conclusions générales

Dans ce travail, nous avons cherché à suivre la libération d'un traceur incorporé dans la phase interne d'une émulsion H/E et à étudier l'influence de paramètres de formulation sur le type et la vitesse de transport.

Une telle étude nécessite tout d'abord la mise au point d'un modèle expérimental et d'une méthode de contrôle dimensionnel de la phase dispersée. Nous avons recherché un modèle d'émulsion simple, stable et de fabrication reproductible, permettant une très bonne séparation des deux phases afin de suivre la répartition du traceur en fonction du temps.

Parmi les nombreuses techniques disponibles pour l'analyse de la distribution de la phase dispersée, nous avons choisi un compteur électronique (le compteur de Coulter); il est d'une utilisation rapide et son champ d'application couvre presque entièrement la gamme des dimensions des particules rencontrées dans les émulsions pharmaceutiques.

Les résultats obtenus prouvent qu'on dispose d'une technique précise et reproductible. Il faut cependant rechercher les conditions expérimentales adéquates et s'assurer que les calculs des dimensions des gouttelettes ainsi que l'interprétation des résultats reflètent exactement

les caractéristiques du modèle. De plus, ce genre de mesures constitue un excellent moyen de contrôle de la stabilité de ces systèmes dispersés.

Nous avons ensuite consacré la seconde partie de ce travail à la recherche d'un modèle mathématique susceptible de décrire le processus de transport d'un médicament, d'une phase à l'autre et dans un milieu récepteur.

Les deux cas envisagés sont caractérisés, l'un par la présence d'une barrière interfaciale s'opposant à la diffusion, l'autre par l'absence d'un film rigide.

Pour cela, nous avons eu recours à une cellule de diffusion mise au point dans nos laboratoires. Des essais préliminaires ont permis de contrôler que ce dispositif présente de très bons caractères de reproductibilité.

Les résultats obtenus conduisent aux conclusions suivantes :

- Le principe actif se partage instantanément entre les phases lors de la fabrication de l'émulsion.
- La surface interfaciale n'influence pas de façon significative le passage du traceur.
- Ces deux premières constations permettent d'envisager un transport en absence de barrière interfaciale, ce que nous avons pu confirmer par simulation.

Par la suite, nous avons cherché à étudier l'influence de paramètres de formulation, tels que concentration en tensio-actif, rapport des volumes des phases, nature du traceur et nature du tensio-actif.

Dans tous les cas examinés, nous avons observé l'absence d'une barrière interfaciale ralentissant la diffusion. Les différences constatées dans les exemples étudiés sont dues aux valeurs de perméabilité et de coefficient de partage effectif propres à chaque condition expérimentale; elles permettent en outre de moduler la vitesse de libération.

Malgré la très forte viscosité de l'interface constatée dans la plupart des cas<sup>125</sup>, l'émulgateur ne forme qu'un réseau très poreux ne constituant pas d'obstacle au transport.

Pour l'administration de certains médicaments, il est souhaitable de freiner la libération du principe actif<sup>126</sup>.

Dans ce cas, il faudrait disposer d'un système émulsionné comprenant une barrière rigide qui ralentit le transport. Deux techniques ont été utilisées dans la réalisation pratique de ces films :

- a) Le micro-encapsulage de gouttelettes au moyen de polymères divers (polymérisation interfaciale)<sup>12-14, 127, 128</sup>.
- b) Formation de complexes à l'interface<sup>129-131</sup>.

Le micro-encapsulage aboutit à des formes galéniques qui s'éloignent de la définition classique de l'émulsion, mais il pourrait permettre la réalisation de cette barrière destinée à ralentir la libération.

Dans l'ensemble des formes médicamenteuses, les émulsions doivent leur moindre importance à leur instabilité thermodynamique.

Néanmoins, il ne faut pas oublier les avantages qu'elles présentent pour l'administration de médicaments liposolubles<sup>132</sup>. Dans certains cas, elles permettent de masquer un goût désagréable, dans d'autres elles facilitent l'absorption dans le tractus gastro-intestinal<sup>133-137</sup>. Citons à titre d'exemple, l'administration orale de sulfamidés; *Feinstein*<sup>133</sup> puis *Daeschner*<sup>134</sup> ont mis en évidence une absorption plus rapide et plus complète de ces médicaments s'ils sont incorporés dans une émulsion plutôt que sous forme de suspension aqueuse. Les mêmes constatations ont été faites pour l'administration de la vitamine A<sup>135</sup>, d'un anti-inflammatoire<sup>136</sup> et de la griséofulvine<sup>137</sup>.

\* \* \* \* \*

BIBLIOGRAPHIE

1. Higuchi W.I. et Higuchi T., J. Amer. Pharm. Ass. (Sci.Ed.) 49, 598 (1960).
2. Higuchi T., J. Soc. Cosmet. Chem. 11, 85 (1960).
3. Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 51, 802 (1962).
4. Müller F., Krogerus V.E. et Vuorinen L., Pharm. Acta Helv. 43, 338 (1968).
5. Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 53, 405 (1964).
6. Goldberg A.H., Higuchi W.I., Ho N.F.H. et Zografì G., J. Pharm. Sci. (Washington) 56, 1432 (1967).
7. Goldberg A.H., Higuchi W.I., Ho N.F.H. et Zografì G., J. Pharm. Sci. (Washington) 58, 1341 (1969).
8. Koizumi T. et Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 57, 87 (1968).
9. Koizumi T. et Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 57, 93 (1968).
10. Howard S.A., Farvar M.A., Suzuki A. et Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 58, 1325 (1969).
11. Howard S.A., Suzuki A., Farvar M.A. et Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. (Washington) 58, 1330 (1969).
12. Ghanem A.H., Higuchi W.I. et Simonelli A.P., J. Pharm. Sci. (Washington) 58, 165 (1969).
13. Ghanem A.H., Higuchi W.I. et Simonelli A.P., J. Pharm. Sci. (Washington) 59, 232 (1970).
14. Ghanem A.H., Higuchi W.I. et Simonelli A.P., J. Pharm. Sci. (Washington) 59, 659 (1970).
15. Higuchi W.I., Ghanem A.H. et Bikhazi A.B., Fed. Proc. 29, 1327 (1970).

16. *Bikhazi A.B. et Higuchi W.I.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 59, 744 (1970).
17. *Bikhazi A.B. et Higuchi W.I.*, Biochim. Biophys. Acta 233, 676 (1971).
18. *Surpuriya V. et Higuchi W.I.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 61, 375 (1972).
19. *Yotsuyanagi T., Higuchi W.I. et Ghanem A.H.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 62, 40 (1973).
20. *Waggoner W.G. et Fincher J.H.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 60, 1830 (1971).
21. *Minkov E., Ovcharov R., Mihailova D., Bogdanova Sv., Kassarova M. et Koburova K.*, Pharm. Ind. 36, 446 (1974).
22. *Bates T.R. et Segueira J.A.* J. Pharm. Sci. (Washington) 64, 793 (1973).
23. *Higuchi W.I.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 56, 315 (1967).
24. *Emmanueli-Orecchioni A.M.*, Labo-Pharma-Problèmes et Techniques 245, 675 (1975).
25. *Griffin W.C.*, J. Soc. Cosmet. Chem. 5, 249 (1954).
26. *Lachampt F. et Vila R.M.*, Parfum. Cosmet. Savons 10, 372 (1967).
27. *Garrett E.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 54, 1557 (1965).
28. *Simmonite D.*, Pharm. J. 163, 386 (1949).
29. *Münzel K.*, Pharm. Acta Helv. 17, 241 (1942).
30. *Levius H.P. et Drommond F.G.*, J. Pharm. Pharmacol. 5, 743 (1953).
31. *Becher P.*, J. Colloid Sci. 24, 91 (1967).
32. *Elworthy P.H. et Florence A.T.*, J. Pharm. Pharmacol. 19, 140S (1967).
33. *Shotton E. et White R.*, J. Pharm. Pharmacol. 12, 108T (1960).
34. *Van den Tempel M.*, J. Colloid Sci. 16, 284 (1961).

35. *Brodnyan J.G. et Brown G.L.*, J. Colloid Sci. 15, 76 (1960).
36. *Saunders F.L.*, J. Colloid Sci. 16, 13 (1961).
37. *Lloyd N.E.*, J. Colloid Sci. 14, 441 (1959).
38. *Walstra P.*, J. Colloid Sci. 27, 493 (1968).
39. *Derjaguin B.V. et coll.*, J. Colloid Sci. 17, 605 (1962).
40. *Freshwater D.C., Scarlett B. et Groves M.J.*, Am. Perfum. Cosmet. 81, 43 (1966).
41. *Garrett C.R.*, J. Soc. Cosmet. Chem. 21, 393 (1970).
42. *Vold R.D. et Mittal K.L.*, J. Soc. Cosmet. Chem. 23, 171 (1972).
43. *Groves M.J., Kaye B.H. et Scarlett B.*, Brit. Chem. Eng. 9, 742 (1964).
44. *Becher P.*, Microscopic Measurement, dans Emulsion, Theory and Practice, II ed., Reinhold Publishing Corporation, 1966, p. 415.
45. *Groves M.J. et Freshwater D.C.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 57, 1273 (1968).
46. *Coulter W.H.*, Proc. Nat. Electron. Conf. 12, 1034 (1956).
47. *Mattern C., Brackett F. et Olson B.*, J. Appl. Physiol. 10, 56 (1957).
48. *Richard W. et Breakell E.*, Am. J. Clin. Pathol. 31, 384 (1959).
49. *Matthews B.A. et Rhodes C.T.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 56, 838 (1967).
50. *Hem S.L., Skauen D.M. et Beal H.M.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 56, 229 (1967).
51. *Higuchi W.I., Rowe E.L. et Hiestand E.N.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 52, 162 (1963).
52. *Higuchi W.I. et Sead H.Y.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 54, 74 (1965).

53. *Amacker P. et Boymond P.*, *Pharm. Acta Helv.* 42, 357 (1967).
54. *Groves M.J.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 161 (1966).
55. *Groves M.J.*, *Pharm. J.* 139, 227 (1964).
56. *Ho N.F.H., Church R.L. et Lee H.*, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1, 356 (1967).
57. *Wachtel R.E. et La Mer V.K.*, *J. Colloid Sci.* 17, 531 (1962).
58. *Rowe E.L.*, *J. Pharm. Sci. (Washington)* 54, 260 (1965).
59. *Schrenzel M.*, *Pharm. Acta Helv.* 41, 218 (1966).
60. *Cornell D.G. et Pallanch M.J.*, *J. Dairy Sci.* 49, 1372 (1966).
61. *Becher P.*, *J. Colloid Sci.* 24, 91 (1967).
62. *Shotton E. et Davis S.S.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 430 (1968).
63. *Walstra P. et Oortwijn H.*, *J. Colloid Sci.* 29, 424 (1969).
64. *Rehfeld S.J.*, *J. Colloid Sci.* 24, 358 (1971).
65. *Matthews B.A.*, *Can. J. Pharm. Sci.* 6, 29 (1971).
66. *Vu T.D., Puisieux F., Alexandre P. et Didry J.*, *Pharm. Acta Helv.* 49, 309 (1975).
67. *Matthews B.A. et Rhodes C.T.*, *J. Pharm. Sci. (Washington)* 57, 569 (1968).
68. *Matthews B.A. et Rhodes C.T.*, *J. Pharm. Sci. (Washington)* 59, 1360 (1970).
69. *Kubitschek H.E.*, *Nature* 182, 234 (1958).
70. *Deysson G. et Nguyen Thi Lan*, *Ann. Pharm. Franç.* 21, 275 (1963).
71. *Parker M.S., Barnes M. et Bradley T.J.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, suppl. 103S (1966).

72. *Hibbert H.R. et Tallentire A.*, J. Pharm. Pharmacol. 18, suppl. 39S (1966).
73. *Rye R.M. et Wiseman D.*, J. Pharm. Pharmacol. 19, Suppl. 9S (1967).
74. *Matthews B.A.*, dans Conférence "Uses of the Coulter Counter in the Pharmaceutical Industry" Bâle, Nov. 13th, 1969.
75. *Hartman B.K., Pattengill O.S. et Sorenson G.D.*, Science 165, 297 (1969).
76. *Edmundson I.C.*, Particle-size Analysis, dans Advances in Pharmaceutical Sciences, vol. 2, Academic Press, London and New York, 1967, p. 153.
77. *Groves M.J.*, Proc. Soc. Anal. Chem. 5, 167 (1968).
78. *Bardet L., Delonca H., Lacoste J. et Maillols H.*, Trav. Soc. Pharm. de Montpellier 29, 101 (1969).
79. *Higuchi W.I., Okada R. et Lemberger A.P.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 51, 683 (1962).
80. *Lemberger A.P. et Mourad N.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 54, 229 (1965).
81. *Lemberger A.P. et Mourad N.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 54, 233 (1965).
82. *Groves M.J.*, J. Pharm. Pharmacol. 18, 305 (1966).
83. *Mima H. et Kitamori N.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 55, 44 (1966).
84. *Bernstein D.F., Higuchi W.I. et Ho N.F.H.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 60, 690 (1971).
85. *Edmundson I.C.*, Nature 212, 1450 (1966).
86. *Eckhoff R.K.*, Nature 210, 765 (1966).
87. *Jowett A.*, Nature 212, 1450 (1966).
88. *Samyn J. et McGee J.P.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 54, 1794 (1965).
89. *Shotton E. et Davis S.S.*, J. Pharm. Pharmacol. 20, 825 (1968).

90. Sprow F.B., *AIChE J.* 13, 995 (1967).
91. Singleton W.S. et Brown M.L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 312 (1965).
92. Vree T.B., Muskens A. et Van Rossum J.M., *J. Pharm. Pharmacol.* 21, 774 (1969).
93. Huber W., *Titration in Nonaqueous Solvents*, Academic Press, New York and London, 1967.
94. Reese D.R., Irwin G.M., Dittert L.W., Chong C.W. et Swintosky, *J. Pharm. Sci. (Washington)* 53, 591 (1964).
95. Murthy K.S. et Zografi G., *J. Pharm. Sci. (Washington)* 59, 1282 (1970).
96. Doelker E. et Buri P., *Pharm. Acta Helv.* 47, 495 (1972).
97. Patel N.K. et Kostenbauder H.B., *J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.)* 47, 289 (1958).
98. Jürgensen G., *Thèse Zürich* (1966).
99. <sup>o</sup>Agren A., *Acta Pharm. Suec.* 5, 37 (1968).
100. Goldberg A.H., Zografi G. et Higuchi W.I., *J. Pharm. Sci. (Washington)* 56, 309 (1967).
101. Brown K.F. et Crooks M.J., *Pharm. Acta Helv.* 48, 494 (1973).
102. <sup>o</sup>Agren A. et Elofsson R., *Acta Pharm. Suec.* 4, 281 (1967).
103. Nakano M., *J. Pharm. Sci. (Washington)* 60, 571 (1971).
104. Crevoisier C.A., *Thèse No 1676*, Genève (1974).
105. Kakemi K., Arita T. et Muranishi S., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 13, 976 (1965).
106. Gordon A.R., *J. Chem. Phys.* 5, 522 (1937).
107. Sherman P., *General Properties of Emulsions and their Constituents*, dans *Emulsion Science*, Academic Press, London and New York, 1968, p. 131.

108. *Florence A.T. et Rogers J.A.*, J. Pharm. Pharmacol. 23, 153 (1971).
109. *Florence A.T. et Rogers J.A.*, J. Pharm. Pharmacol. 23, 233 (1971).
110. *Becher P.*, The Chemistry of Emulsifying Agents, dans *Emulsions, Theory and Practice*, II ed., Reinhold Publishing Corporation, New York, 1965, p. 209-266.
111. *Swarbrick J.*, dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, XV ed., Mack Publishing Company, 1975, p. 329.
112. *Shotton E. et Davis S.S.*, J. Pharm. Pharmacol. 19, suppl. 130S (1967).
113. *Shotton E. et Davis S.S.*, J. Pharm. Pharmacol. 20, 439 (1968).
114. *Thovert J.*, C.R. Acad. Sci. 135, 579 (1902).
115. *Martin A.N., Swarbrick J. et Cammarata H.*, dans *Physical Pharmacy*, Lea Febiger, Philadelphia, 1969, p. 451.
116. *Rahm H.*, Thèse No 3787, Zürich (1966).
117. *Rahm H., Soliva M. et Speiser P.*, Pharm. Acta Helv. 44, 1 (1969).
118. *Rahm H., Soliva M. et Speiser P.*, Pharm. Acta Helv. 44, 356 (1969).
119. *Seiller M., Legras T., Puisieux F. et Le Hir A.*, Ann. Pharm. Franç. 28, 425 (1970).
120. *Seiller M., Legras T., Lo I., Tréguier J.P. et Puisieux F.*, Pharm. Acta Helv. 47, 516 (1972).
121. *Schrenzel M.*, Pharm. Acta Helv. 45, 754 (1970).
122. *Spittle R.Y. et Hartman C.W.*, J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) 49, 325 (1960).
123. *Rhyne J.W., Payne W.J. et Hartman C.W.*, J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) 49, 234 (1960).
124. *Lin G.M., Sadik F., Gilmore W.F. et Fincher J.H.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 63, 666 (1974).

125. *Carless J.E. et Hallworth G.W.*, J. Colloid Sci. 26, 75 (1968).
126. *Ljungberg S. et Jeppsson R.*, Acta Pharm. Suec. 7, 435 (1970).
127. *Doelker E. et Buri P.*, Pharm. Acta Helv. 50, 73 (1975).
128. *Merkle H.P.*, Thèse EPF Zürich (1972).
129. *Warburton B.*, Thèse Université de Londres (1973).
130. *Shotton E. et Wibberley K.*, J. Pharm. Pharmacol. 12, 105T (1960).
131. *Shotton E.*, J. Pharm. Pharmacol. 7, 990 (1955).
132. *Davis S.S.*, J. Clin. Pharm. 1, 11 (1976).
133. *Feinstone W.H., Wolff R. et Williams R.D.*, J. Bact. 39, 47 (1940).
134. *Daeschner C.W., Bell W.R., Stivrius P.C., Yow E.M. Townsend E.*, Am. Med. Ass. J. Dis. Child. 93, 370 (1957).
135. *Lewis J.M., Cohlar S.A. et Messina A.*, Pediatrics 5, 425 (1950).
136. *Wagner J.G., Gerrard E.S. et Kaiser D.G.*, Clin. Pharmac. Therap. 7, 610 (1966).
137. *Carrigan P.J. et Bates T.R.*, J. Pharm. Sci. (Washington) 62, 1476 (1973).

\* \* \* \* \*





